

**Charakterisierung der  
proteolytischen Prozessierung  
der Matriline**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

Vorgelegt von

Harald Wilhelm Antonius Ehlen

aus Köln

im Dezember 2005

Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Paulsson

und

Prof. Dr. rer. nat. H. W. Klein

Tag der mündlichen Prüfung: 20.02. 2006

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>V</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 DIE MATRILINE.....	1
1.1.1 Modulare Domänenstruktur der Matriline .....	1
1.1.2 Alternatives Spleißen .....	3
1.1.3 Evolution der Matriline .....	4
1.1.4 Oligomerisierung und Heterogenität der Matriline .....	5
1.1.5 Proteolytische Prozessierung von Matrilin-3 und -4 .....	7
1.1.6 Gewebeverteilung der Matriline.....	8
1.1.7 Interaktionspartner und supramolekulare Assemblierung .....	9
1.1.8 Matriline und menschliche Erkrankungen.....	10
1.2 PROTEOLYTISCHE PROZESSIERUNG VON PROTEINEN .....	12
1.2.1 Proteolytische Enzyme .....	13
1.2.2 Proteolytische Prozessierung in Kompartimenten des sekretorischen Transportweges.....	14
1.2.3 Transmembranproteasen an der Zelloberfläche .....	15
1.2.4 Sezernierte Proteasen der extrazellulären Matrix .....	17
1.2.5 Regulation der Expression und Aktivität von Proteasen.....	20
1.3 AUFGABENSTELLUNG .....	21
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>22</b>
2.1 MATERIAL.....	22
2.1.1 Allgemeine Lösungen und Puffer .....	22
2.1.2 Nährmedien für Bakterien.....	23
2.1.3 Bakterienstämme.....	23
2.1.4 Klonierungs- und Expressionsvektoren .....	23
2.1.5 Oligonukleotide.....	24
2.1.6 DNA-Längenstandard und Protein-Molekulargewichtsstandards.....	25
2.1.7 Antikörper .....	25
2.2 ALLGEMEINE MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITEN.....	26
2.2.1 Herstellung und Lagerung von Bakterienkulturen .....	26
2.2.2 Herstellung transformativkompetenter Bakterien .....	26
2.2.3 Transformation von Bakterien durch Hitzeschock.....	26

2.2.4	DNA-Präparation aus Bakterienkulturen .....	27
2.2.5	DNA-Präzipitation .....	27
2.2.6	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	27
2.2.7	Agarosegelelektrophorese.....	27
2.2.8	Elution von DNA aus Agarosegelen und Aufreinigung aus Lösungen .....	28
2.2.9	Restriktionsspaltung von DNA.....	28
2.2.10	Ligation von DNA-Fragmenten .....	28
2.2.11	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	29
2.2.12	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse .....	30
2.2.13	Extraktion und Aufreinigung von mRNA aus Gehirngewebe.....	30
2.2.14	Präzipitation von RNA .....	30
2.2.15	Reverse Transkription von mRNA und Amplifikation der Matrilin-4 Transkripte .....	31
2.2.16	Klonierung von Volllänge Matrilinkonstrukten mit wildtypischem und mutiertem „EE“-Motiv.....	31
2.2.17	Herstellung wildtypischer und chimärer Matrilin-4 Konstrukte ohne VWA1 Domäne .....	32
2.3	ZELLKULTURARBEITEN.....	33
2.3.1	Kultivierung und Expansion von 293EBNA Zellen.....	33
2.3.2	Kryokonservierung von Zellen .....	33
2.3.3	Transfektion von 293EBNA Zellen .....	33
2.3.4	Ernte serumfreier, konditionierter Überstände.....	34
2.3.5	Inkubation Matrilin-4 exprimierender Zellen mit Proteaseinhibitoren.....	34
2.3.6	Isolierung und Kultivierung primärer muriner Chondrozyten .....	35
2.4	PROTEINCHEMISCHE METHODEN.....	36
2.4.1	Affinitätsreinigung rekombinanter Proteine.....	36
2.4.2	Sequentielle Extraktion von Proteinen aus Geweben .....	37
2.4.3	Herstellung und Affinitätsreinigung von Antikörpern.....	38
2.4.4	Verdau von Matrilin-4 mit Trypsin.....	39
2.4.5	Präzipitation von Proteinen.....	39
2.4.6	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford .....	39
2.4.7	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	40
2.4.8	Coomassie Färbung von Proteinen .....	40
2.4.9	Western Blot (Immunoblot).....	41
2.4.10	MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption and ionisation – time of flight) Analysen.....	42
2.4.11	N-terminale Sequenzierung von Proteinen nach Edman .....	42

2.4.12	Inkubation von Matrilin-4 mit Proteasen .....	43
2.4.13	<i>Pulse-chase</i> Experiment zur Analyse der Sekretionskinetik prozessierter Matrilin 4 Fragmente.....	43
2.4.14	Subzelluläre Fraktionierung von 293EBNA Zellen durch isopyknische Dichtegradientenzentrifugation.....	44
2.5	IMMUNHISTOLOGISCHE METHODEN.....	45
2.5.1	Erstellung von Gefrierschnitten .....	45
2.5.2	Immunfluoreszenznachweis von Proteinen .....	45
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>47</b>
3.1	CHARAKTERISIERUNG DES HETEROGENEN ERSCHEINUNGSBILDES DER MATRILINE47	
3.1.1	Vergleich rekombinant exprimierter Matriline mit Matrilinen aus murinen Geweben .....	47
3.1.2	Matriline in Knorpelextrakten von Patienten mit Osteoarthritis .....	50
3.2	BESTIMMUNG DER PROZESSIERUNGSTELLEN IN DER SCHARNIERREGION DER MATRILINE .....	52
3.2.1	Charakterisierung der potentiellen Proteaseschnittstelle durch Austausch der konservierten Glutamatreste in der Scharnierregion der Matriline .....	52
3.2.2	Bestimmung der Prozessierungsstellen von rekombinantem Matrilin-3.....	55
3.2.3	Klonierung und rekombinante Expression verkürzter Matrilin-4 Proteine mit Matrilin-1 Scharnierregion .....	59
3.3	UNTERSUCHUNGEN ZUM MECHANISMUS DER PROZESSIERUNG VON MATRILIN-4 ..60	
3.3.1	Inkubation von Zellkulturüberständen.....	61
3.3.2	Kinetische Untersuchung der Sekretion prozessierter Matrilin-4 Fragmente .....	62
3.3.3	Aufreinigung prozessierter Matrilin-4 Oligomere aus Zelllysaten .....	63
3.3.4	Subzelluläre Lokalisation prozessierter Matrilin-4 Fragmente.....	64
3.4	VERSUCHE ZUR IDENTIFIKATION VON PROTEASEN, DIE MATRILIN-4 SPALTEN.....	66
3.4.1	<i>In silico</i> Analyse zur Identifikation potentieller Matrilin-4-spaltender Proteasen .....	66
3.4.2	Koexpression und -inkubation von Matrilin-4 mit verschiedenen Proteasen .....	67
3.4.3	Inhibitionsexperiment Matrilin-4 exprimierender Zellen .....	70
3.5	GEWEBESPEZIFISCHE PROZESSIERUNG VON MATRILIN-4 .....	73
3.5.1	Herstellung und Auswahl Schnittstellen-spezifischer Neo-Epitop Antikörper .....	73
3.5.2	Prozessierung von Matrilin-4 in Primärkulturen muriner Chondrozyten .....	76

3.5.3	Untersuchung der heterogenen Matrilin-4 Bandenmuster in Gewebe- extrakten mit den Neo-Epitop Antikörpern.....	77
3.5.4	Gewebespezifische Prozessierung von Matrilin-4 .....	79
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>83</b>
4.1	PROTEOLYTISCHE PROZESSIERUNG DER MATRILINE IM GEWEBE UND NACH REKOMBINANTER EXPRESSION .....	83
4.1.1	Proteolytische Prozessierung rekombinanter Matriline .....	83
4.1.2	Das heterogene Erscheinungsbild der Matriline im Gewebe.....	84
4.1.3	Altersbedingte Veränderungen der Heterogenität von Matrilin-4 .....	85
4.2	CHARAKTERISIERUNG POTENTIELLER PROZESSIERUNGSSTELLEN IN DER C- TERMINALEN SCHARNIERREGION DER MATRILINE .....	86
4.2.1	Prozessierung rekombinanter Matriline mit mutiertem „EE“-Motiv .....	86
4.2.2	Einfluss struktureller Elemente der Matriline auf die Prozessierung .....	88
4.3	UNTERSUCHUNGEN ZUM MECHANISMUS DER PROTEOLYTISCHEN PROZESSIERUNG VON MATRILIN-4.....	91
4.3.1	Lokalisation der Prozessierung .....	91
4.3.2	Proteasen, die Matrilin-4 spalten können .....	92
4.3.3	Einfluss verschiedener Proteaseinhibitoren auf die proteolytische Prozessierung von Matrilin-4 .....	94
4.4	GEWEBESPEZIFISCHE PROZESSIERUNG VON MATRILIN-4 .....	96
4.5	PHYSIOLOGISCHE RELEVANZ DER PROTEOLYTISCHEN PROZESSIERUNG .....	97
4.6	AUSBLICK .....	99
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>101</b>
<b>6</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>102</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>103</b>
<b>DANKE</b>	<b>.....</b>	<b>113</b>
<b>TEILPUBLIKATIONEN</b>	<b>.....</b>	<b>114</b>
<b>ERKLÄRUNG</b>	<b>.....</b>	<b>115</b>
<b>LEBENS LAUF</b>	<b>.....</b>	<b>116</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
ADAMTS	ADAM mit Thrombospondin Typ I-ähnlichen Domänen
Amp	Ampicillin
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
CC	<i>coiled-coil</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
CMP	<i>cartilage matrix protein</i> , auch: Matrilin-1
COMP	<i>cartilage oligomeric matrix protein</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherischia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
EST	<i>expressed sequence tag</i>
FCS	fötales Kälberserum
gp	<i>guinea pig</i> , Meerschweinchen
hK	humanes Kallikrein
HRP	Meerrettichperoxidase
LB	Luria Bertani
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption and ionisation – time of flight</i>
MIDAS	<i>metal ion-dependent adhesion site</i>
MMP	Matrix Metalloprotease
mRNA	<i>messenger Ribonukleinsäure</i>
MT-MMP	<i>membrane type MMP</i>
NEM	N-Ethylmaleinimid
p. c.	<i>post coitum</i>
PC	Proteinkonvertase
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDI	Proteindisulfidisomerase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Presenilin

PVDF	Polyvinylidenfluorid
ra	<i>rabbit</i> , Kaninchen
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription mit anschließender PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SV	Säulenvolumen
TFA	Trifluoressigsäure
TGF	<i>transforming growth factor</i>
VWA	von Willebrand Faktor A-ähnliche (Domäne)
ZBA	Zentrale Bioanalytik des ZMMK
ZMMK	Zentrum für molekulare Medizin, Köln

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Matriline

Die Matriline sind eine Familie nicht-kollagener Proteine der extrazellulären Matrix, die einen eigenen Zweig in der Oberfamilie von Proteinen mit von Willebrand Faktor A (VWA) ähnlichen Domänen bildet (zur Übersicht s. Whittaker & Hynes, 2002). Die Familie besteht aus vier Mitgliedern und kommt ausschließlich in Vertebraten vor (zur Übersicht s. Wagener *et al.*, 2005). Da die Genome einiger Vertebraten inzwischen vollständig sequenziert wurden, ist es nahezu ausgeschlossen, dass noch weitere Matriline existieren.

Matrilin-1 wurde als erstes Mitglied der Familie als ein an Proteoglykane aus bovinem Trachealknorpel gebundenes Protein entdeckt und zunächst als *cartilage matrix protein* (CMP) bezeichnet (Paulsson & Heinegård, 1979). Matrilin-2 wurde erst vor einigen Jahren beim Durchsuchen einer epiphysären cDNA Bank mit einer Matrilin-1 Sonde identifiziert (Deák *et al.*, 1997), während Matrilin-3 (Wagener *et al.*, 1997) und Matrilin-4 (Wagener *et al.*, 1998a) in *expressed sequence tag* (EST)-Datenbanken gefunden wurden. Im Zebrafisch *Danio rerio* konnte bis dato kein Gen für Matrilin-2 entdeckt werden, allerdings existieren in *Danio rerio* und dem Kugelfisch *Takifugu rubripes* je zwei Gene für Matrilin-3, deren Translationsprodukte als Matrilin-3a bzw. Matrilin-3b bezeichnet wurden (Ko *et al.*, 2005). Auch Matrilin-1 und -4 sind im Zebra- und Kugelfisch vorhanden.

### 1.1.1 Modulare Domänenstruktur der Matriline

Die Matriline sind wie zahlreiche andere Proteine der extrazellulären Matrix aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt. Ein N-terminales Signalpeptid vermittelt die Sekretion der Proteine in das extrazelluläre Milieu. Das strukturelle Hauptmerkmal bilden zwei VWA Domänen, die durch eine unterschiedliche Anzahl epidermaler Wachstumsfaktor ähnlichen (EGF) Domänen miteinander verbunden sind (s. Abb. 1.1). Die zweite VWA Domäne fehlt bei Matrilin-3. Am C-Terminus besitzen alle Matriline eine tripelhelikale *coiled-coil* Domäne, die für die Oligomerisierung der Proteine verantwortlich ist und über eine kurze Scharnierregion von zwei bis elf Aminosäureresten mit der zweiten VWA Domäne bzw. der vierten EGF Domäne (bei Matrilin-3) verbunden ist. Bei Matrilin-2 werden die zweite VWA Domäne und die *coiled-coil* Domäne zusätzlich von einer für die Matriline einzigartigen Sequenz von 75 Aminosäureresten N-terminal der Scharnierregion separiert. Diese Sequenz besitzt keine Homologie zu bekannten Domänen anderer Proteine und wird *unique* Sequenz

genannt. Weiterhin besitzen Matrilin-2 und Matrilin-3 am N-Terminus eine durch sechs bzw. sieben Argininreste positiv geladene Sequenz.

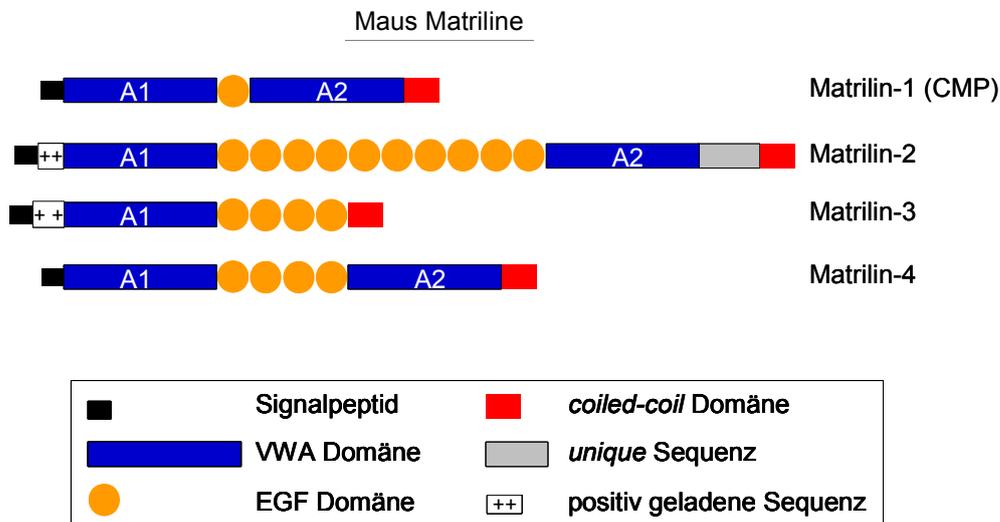


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der modularen Domänenstruktur der murinen Matrilin.

Matrilin-1 besitzt nur eine EGF Domäne (Kiss *et al.*, 1989) und das Monomer hat ein Molekulargewicht von 52 kDa mit einem Kohlenhydratanteil von 3,9% (Paulsson & Heinegård, 1981). Bei Matrilin-2 verknüpfen zehn EGF Domänen die VWA Domänen miteinander, so dass das Monomer mit einem theoretischen Molekulargewicht von 104,3 kDa den größten Vertreter der Proteinfamilie darstellt (Deák *et al.*, 1997; Muratoglu *et al.*, 2000). Matrilin-3 und murines Matrilin-4 haben je vier EGF Domänen und die Monomere besitzen theoretische Molekulargewichte von 49,3 bzw. 66,4 kDa (Wagener *et al.*, 1997; Wagener *et al.*, 1998a; Wagener *et al.*, 2000). Humanem Matrilin-4 fehlt die erste EGF Domäne (Wagener *et al.*, 1998b). Während rekombinantes Matrilin-3 nicht glykosyliert wird (Klatt *et al.*, 2000), trägt rekombinantes Matrilin-2 N-Glykane (Piecha *et al.*, 1999) und bei rekombinantem Matrilin-4 sind 7% des gemessenen Molekulargewichts von 72,9 kDa auf posttranslationale Modifikationen zurückzuführen (Klatt *et al.*, 2001).

VWA Domänen sind Bestandteil vieler extrazellulärer Proteine wie verschiedene Kollagene, AMACO und WARP (Whittaker & Hynes, 2002). Ihre ungefähr 200 Aminosäurereste bilden eine klassische  $\alpha/\beta$ -Rossmann Faltung, bei der ein zentrales  $\beta$ -Faltblatt von mehreren  $\alpha$ -Helices umspannt wird. Ein MIDAS (*metal ion-dependent adhesion site*) Motiv mit der Konsensussequenz DXSXSX<sub>n</sub>TX<sub>n</sub>D vermittelt die Koordination von Metallionen, was eine wichtige Rolle bei der Interaktion von VWA

Domänen mit Proteinliganden spielt (Lee *et al.*, 1995). Dieses Motiv ist in allen VWA Domänen der Matrilin konserviert.

EGF Domänen bestehen in der Regel aus 40-50 Aminosäureresten und sind ebenfalls bei zahlreichen modular strukturierten Proteinen in mehreren Kopien zu finden. Sie besitzen eine doppelsträngige  $\beta$ -Faltblattstruktur, die von drei konservierten Disulfidbrücken stabilisiert wird. Die Interaktion von EGF Domänen mit Proteinliganden wird über ein gebundenes Kalziumion vermittelt (Rao *et al.*, 1995). Weder die wichtigen Aminosäurereste der Konsensussequenz des Kalziumbindungsmotivs (Handford *et al.*, 1991) noch eine nicht-kanonische Kalziumbindestelle von EGF Domänen anderer Proteine (Malby *et al.*, 2001) sind in den EGF Domänen der Matrilin konserviert.

*Coiled-coil* Domänen zeichnen sich durch repetitive Heptadsequenzen (a-g) aus, bei denen die Positionen a und d üblicherweise von nicht-polaren Aminosäureresten besetzt sind. Sie besitzen eine  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur mit einer Ganghöhe von 3,6 Aminosäureresten. Wenn sich zwei oder mehrere  $\alpha$ -helikale *coiled-coil* Domänen aneinanderlagern, kommen die Aminosäurereste der Positionen a und d in engen Kontakt und interagieren über hydrophobe Wechselwirkungen miteinander. Die *coiled-coil* Domänen der Matrilin bestehen aus 4,5 Heptadsequenzen, wobei diese bei Matrilin-3 die geringste Übereinstimmung mit der Konsensussequenz besitzen. Durch NMR-spektroskopische Untersuchung der Matrilin-1 *coiled-coil* Domäne wurde gezeigt, dass sie erwartungsgemäß eine parallele, dreisträngige  $\alpha$ -Helix bildet, und das Trimer über Disulfidbrücken stabilisiert wird (Dames *et al.*, 1998).

### 1.1.2 Alternatives Spleißen

Durch alternatives Spleißen der Matrilin mRNAs kann die Domänenstruktur der Proteine variiert werden, da die genomischen Exon/Intron-Grenzen oft mit den Domänengrenzen übereinstimmen. In Säugetieren existieren alternative Spleißvarianten von Matrilin-2 und -4, während Transkripte von Matrilin-1 und -3 nicht alternativ gespleißt werden.

Der einzigen Spleißvariante von Matrilin-2, die in Mensch, Maus und Ratte gefunden wurde, fehlen in der C-terminalen *unique* Sequenz 19 Aminosäurereste (Deák *et al.*, 1997; Piecha *et al.*, 1999; Muratoglu *et al.*, 2000). Interessanterweise beinhaltet die herausgespleißte Sequenz einen ungepaarten Cysteinrest, der an der Ausbildung einer Disulfidbrücke beteiligt sein könnte.

In Mäusen existiert eine Matrilin-4 Spleißvariante, der die VWA1 Domäne vollständig fehlt (Wagener *et al.*, 1998a). Diese Variante wurde bisher für humanes Matrilin-4 nicht

nachgewiesen, dafür wurden beim Menschen zwei Matrilin-4 Spleißvarianten entdeckt, denen eine oder zwei der drei EGF Domänen fehlen (Wagener *et al.*, 1998b).

In *Danio rerio* gibt es eine weitaus größere Anzahl alternativ gespleißter Matrilin-Transkripte und es existieren auch Spleißvarianten von Matrilin-1 und -3. Die Varianten besitzen in der Regel eine unterschiedliche Anzahl von EGF Domänen, während die Sequenzen der VWA Domänen in den Sequenzen aller Spleißvarianten vollständig enthalten sind. Das führt im Zebrafisch zu Varianten von Matrilin-1, -3a und -3b, die keine EGF Domänen mehr besitzen. Weiterhin existieren Matrilin-3b Spleißvarianten, die eine nur in diesem Matrilin vorhandene Prolin und Serin/Threonin-reiche Domäne besitzen (Ko *et al.*, 2005).

### 1.1.3 Evolution der Matriline

Ein Vergleich der DNA- und Proteinsequenzen der Matriline legt nahe, dass alle Matriline aus einem Ur-Matrilin entstanden sind. Alle VWA Domänen der Matriline sind enger miteinander verwandt als mit VWA Domänen anderer Proteine, so dass sie sich wahrscheinlich aus einer ursprünglichen VWA Domäne entwickelt haben.

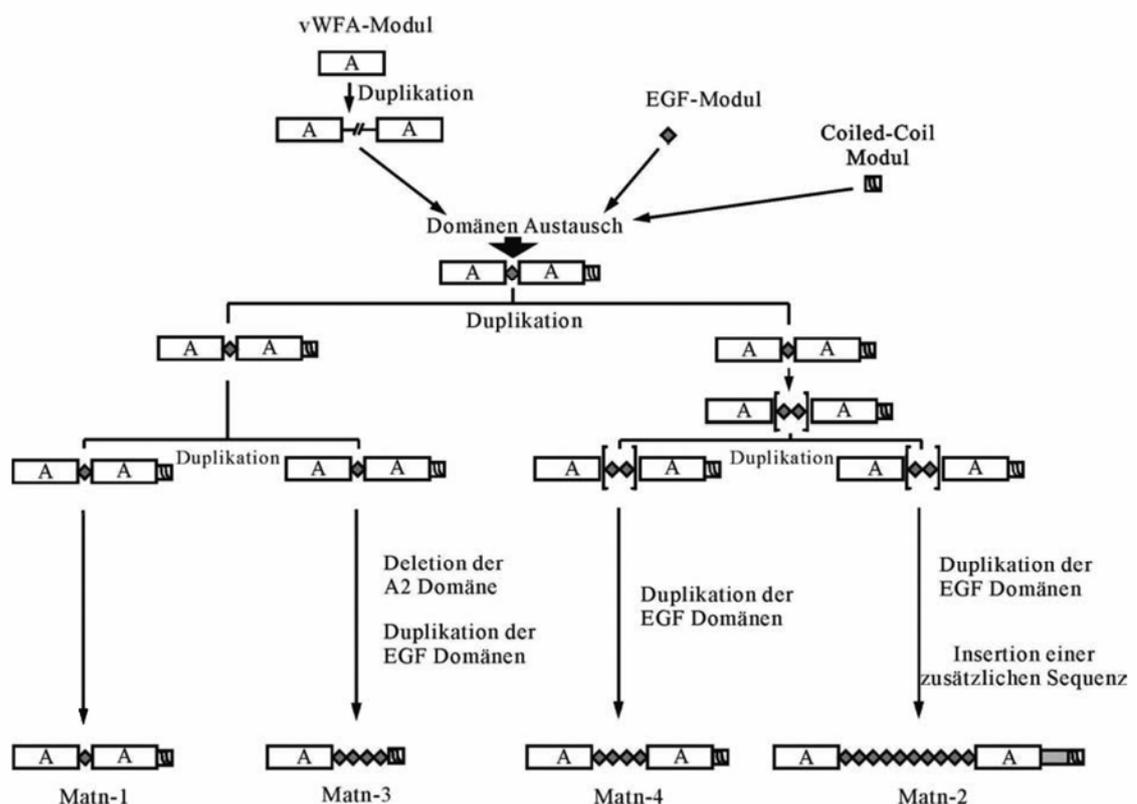


Abb. 1.2: Evolutionsmodell der Matrilinfamilie. Verändert übernommen aus Deák *et al.*, 1999.

Da weiterhin die VWA1 Domänen der einzelnen Matriline enger miteinander verwandt sind als die VWA1 und VWA2 Domänen innerhalb eines Matrilins, wird davon ausgegangen, dass die Ur-VWA Domäne zunächst dupliziert wurde, und es durch anschließende Insertion einer EGF Domäne und einer *coiled-coil* Domäne zur Bildung eines Ur-Matrilins kam. Eine Duplikation des Ur-Matrilin-Gens führte dann zur Bildung der Vorfahren von Matrilin-1 und -3 bzw. Matrilin-2 und -4. Die vier Matriline entstanden letztendlich aus einer weiteren Duplikation dieser Vorfahren und anschließenden Duplikationen der EGF Domänen und Insertionen weiterer Sequenzen. Das Fehlen der VWA2 Domäne von Matrilin-3 ist wahrscheinlich auf eine Deletion des entsprechenden Exons nach der Duplikation des Gens für den Matrilin-1/-3 Vorfahren zurückzuführen (Dèak *et al.*, 1999; s. Abb. 1.2).

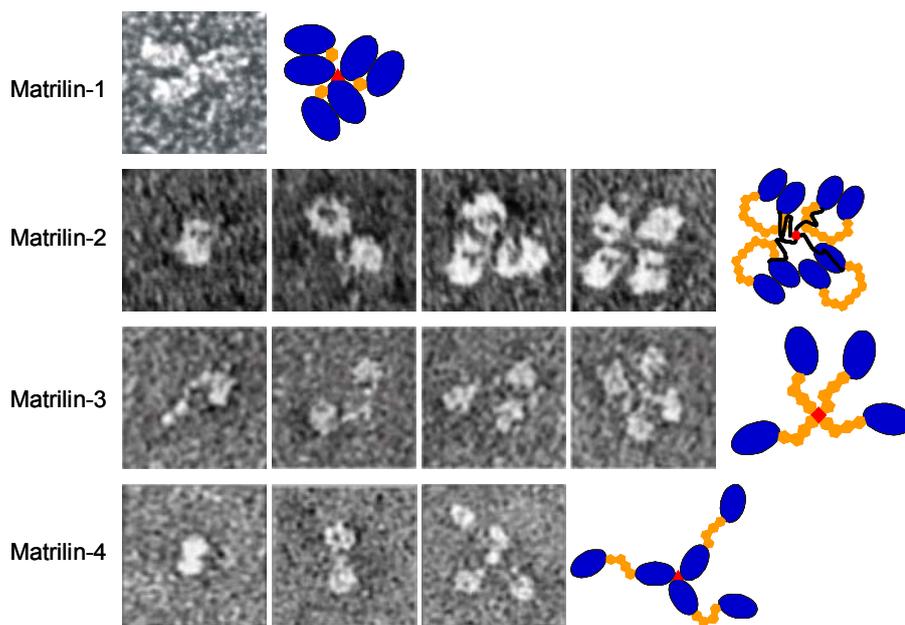
### 1.1.4 Oligomerisierung und Heterogenität der Matriline

Wie bereits erwähnt, bilden die Matriline über ihre C-terminale *coiled-coil* Domäne stabile Oligomere. Zwei unmittelbar N-terminal der *coiled-coil* Domäne liegende, konservierte Cysteinreste stabilisieren die Oligomere über Disulfidbrücken. Elektronenmikroskopische Untersuchungen aufgereinigter Matriline haben gezeigt, dass Matrilin-1 und -4 Trimere bilden (Hauser & Paulsson, 1994; Klatt *et al.*, 2001; s. Abb. 1.3) und Matrilin-2 und -3 Tetramere (Piecha *et al.*, 1999; Klatt *et al.*, 2000). Dabei formen die einzelnen Untereinheiten von Matrilin-1 und -2 kompakte, bei Matrilin-2 ringförmige Strukturen, die auf mögliche Wechselwirkungen der beiden VWA Domänen einer Untereinheit zurückzuführen sein könnten. Die Arme von Matrilin-3, welches nur eine VWA Domäne besitzt, und Matrilin-4 scheinen eher ausgestreckt und flexibler zu sein (s. Abb. 1.3).

Die rekombinanten Matriline-2, -3 und -4 zeigten in Elektronenmikrographien und nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ein ausgeprägt heterogenes Erscheinungsbild. So wurden bei Matrilin-2 und -3 zusätzlich zu den Homotetrameren auch mono-, di- und trimere Varianten des Proteins nachgewiesen, bei Matrilin-4 fand man außer Trimeren auch Mono- und Dimere (s. Abb 1.3; Piecha, *et al.*, 1999; Klatt *et al.*, 2000; Klatt *et al.*, 2001). Dies wurde zunächst auf eine teilweise unvollständige Assemblierung der *coiled-coil* Domänen zurückgeführt. Die SDS-PAGE Bandenmuster endogener Matriline aus Gewebeextrakten und Zellkulturüberständen zeigten eine ähnliche heterogene Fragmentierung wie die Bandenmuster der rekombinanten Proteine (Piecha *et al.*, 1999; Klatt *et al.*, 2001; Klatt, Dissertation, 2001).

In Experimenten mit rekombinanten *coiled-coil* Domänen der Matriline bildeten die *coiled-coil* Domänen von Matrilin-1 und -4 erwartungsgemäß stabile Homotrimere und

die Matrilin-3 *coiled-coil* Domäne Homotetramere (Frank *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu den bei Matrilin-2 im Elektronenmikroskop und SDS-PAGE beobachteten Homotetrameren (Piecha *et al.*, 1999) bildete die rekombinante Matrilin-2 *coiled-coil* Domäne in diesem Versuch nur Homotrimerie. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die Tetramerisierung von Matrilin-2 ausschließlich von der *coiled-coil* Domäne vermittelt wird. Ob weitere strukturelle Elemente, möglicherweise innerhalb der *unique* Sequenz von Matrilin-2, an der Bildung der Tetramere beteiligt sind, wurde bislang nicht geklärt.

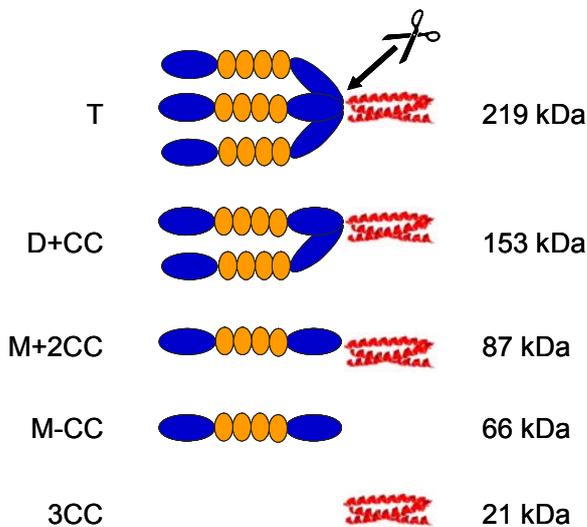


**Abb: 1.3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Matriline.** Links sind Elektronenmikrographien von nativ extrahierten Matrilin-1 Trimeren und unterschiedlichen Oligomeren der rekombinanten Matrilin-2, -3 und -4 dargestellt. Die Modelle wurden anhand der Aufnahmen der Trimere (Matrilin-1 und -4) bzw. Tetramere (Matrilin-2 und -3) erstellt. *Coiled-coil* Domänen sind in rot, VWA Domänen in blau, EGF Domänen in orange und die *unique* Sequenz (Matrilin-2) in schwarz dargestellt. Elektronenmikrographien übernommen aus Hauser & Paulsson, 1994; Piecha *et al.*, 1999; Klatt *et al.*, 2000; Klatt *et al.*, 2001. Modelle verändert übernommen aus Nitsche, Dissertation, 2001.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die rekombinanten Matrilin *coiled-coil* Domänen außer Homooligomeren auch eine Vielzahl von Heterooligomeren unterschiedlicher Stöchiometrien ausbilden können (Frank *et al.*, 2002) Dabei bildeten sich Matrilin-1/-2, -1/-4, -2/-4 und -1/-2/-4 Heterotrimerie, sowie Matrilin-1/-3 Heterotetramere. *In vivo* konnten bislang jedoch nur Matrilin-1/-3 Heterooligomere nachgewiesen werden (Wu & Eyre, 1998; Klatt *et al.*, 2000; Kleemann-Fischer *et al.*, 2001).

### 1.1.5 Proteolytische Prozessierung von Matrilin-3 und -4

Die massenspektrometrische Charakterisierung von rekombinatem, C-terminal StrepII-markiertem Matrilin-4 ergab, dass das Vorkommen der Mono- und Dimere die Folge einer proteolytischen Prozessierung in der Scharnierregion zwischen der VWA2 und der *coiled-coil* Domäne ist (Klatt *et al.*, 2001). Durch die Spaltungen werden einzelne Untereinheiten des Trimers abgeschnitten, so dass monomere (M+2CC<sup>1</sup>) und dimere (D+CC<sup>1</sup>) Prozessierungsprodukte von Matrilin-4 entstehen, die weiterhin eine trimere *coiled-coil* Domäne besitzen (s. Abb. 1.4), sowie abgeschnittene Monomere ohne *coiled-coil* Domäne (M-CC<sup>1</sup>).



**Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Prozessierungsprodukte von rekombinatem Matrilin-4.** Die Schere symbolisiert den Ort der proteolytischen Spaltung. Die farbliche Darstellung der Domänen entspricht der in Abb. 1.1 und 1.3. Die Molekulargewichte der Matrilin-4 Fragmente wurden massenspektrometrisch bestimmt. Zur Nomenklatur der Fragmente s. Fußnote 1. Modifiziert nach Klatt *et al.*, 2001.

Die N-terminale Sequenzierung des C-terminalen Spaltproduktes ergab, dass die Spaltung nach zwei Glutamatresten in der Scharnierregion stattfindet (Klatt *et al.*, 2001). Diese beiden Glutamatreste sind in den Scharnierregionen aller Matriline konserviert (s. Abb. 1.5). Daher wird vermutet, dass es sich dabei um eine konservierte Proteaseschnittstelle handelt und auch die anderen Matriline nach gleichem Schema wie Matrilin-4 proteolytisch prozessiert werden können.

Massenspektrometrische Untersuchungen an rekombinatem Matrilin-3 ergaben, dass die Molekulargewichte der Mono-, Di-, und Trimere von Matrilin-3 mit den theoretischen Massen der entsprechenden Oligomere mit jeweils tetrameren *coiled-coil* Domänen übereinstimmten (Klatt, Dissertation, 2001). Das Vorkommen verschiedener Matrilin-3 Homooligomere scheint also wie bei Matrilin-4 die Folge einer proteolytischen Prozessierung in der Scharnierregion zu sein. Aufgrund der N-terminalen Markierung

<sup>1</sup> Die Bezeichnung der Prozessierungsprodukte entspricht in dieser Arbeit der für Matrilin-4 von Klatt *et al.* (2001) vorgeschlagenen Nomenklatur: Q = Tetramer, T = Trimer, D = Dimer, M = Monomer, CC = *coiled-coil* Domäne. Die Zahl vor „CC“ beziffert die Anzahl zusätzlicher (+) oder fehlender (-) *coiled-coil* Domänen. Z. B.: M+2CC = Monomer mit zwei zusätzlichen prozessierten *coiled-coil* Domänen; M-CC = abgeschnittenes Monomer ohne *coiled-coil* Domäne.

von rekombinantem Matrilin-3 konnten die C-terminalen Prozessierungsprodukte allerdings nicht angereichert werden, so dass eine exakte Bestimmung der Prozessierungsstelle nicht möglich war (Klatt, Dissertation, 2001). Erste Versuche mit rekombinantem Matrilin-4, bei dem die konservierten Glutamatreste gegen zwei Alanin- bzw. Glutaminreste ausgetauscht worden waren, zeigten, dass das „EE“-Motiv als Protease-Erkennungssequenz dient (Ehlen, Diplomarbeit, 2002).



**Abb. 1.5: Aminosäuresequenzen der N-terminal der *coiled-coil* Domäne gelegenen Scharnierregionen der murinen Matriline.** Die Schere markiert die in Matrilin-4 ermittelte Proteaseschnittstelle. Die konservierten Glutamatreste sind blau, Cysteinreste gelb markiert. Die Pfeile oberhalb der Sequenzen markieren die Cysteinreste, die durch Ausbildung von Disulfidbrücken die oligomerisierten *coiled-coil* Domänen stabilisieren. a und d bezeichnen die Positionen der Heptadwiederholungen der *coiled-coil* Domänen.

### 1.1.6 Gewebeverteilung der Matriline

Alle vier Mitglieder der Matrilinfamilie sind in skeletalen Geweben als Bestandteil der extrazellulären Matrix von Knorpel und Knochen zu finden, wobei Matrilin-1 und -3 in diesen Geweben in größerer Menge vorhanden sind als Matrilin-2 und -4. Die Expression der einzelnen Matriline ist dabei zeitlich und örtlich streng reguliert.

Matrilin-1 und -3 werden in Mäusen ab Tag 12,5 p. c. im kondensierenden Mesenchym exprimiert, und mit fortschreitender Entwicklung der skeletalen Gewebe zeigen sie ähnliche Expressionsmuster wie Kollagen II. In späteren Entwicklungsstadien kommen sie jedoch verstärkt in tieferen Schichten des artikulären Knorpels und weniger an dessen Oberfläche vor (Segat *et al.*, 2000; Klatt *et al.*, 2002). Während der endochondralen Ossifikation in der Tibia von Mäusen sind Matrilin-1 und -3 in den Zonen des ruhenden, proliferierenden, hypertrophen und kalzifizierten Knorpels vorhanden (Klatt *et al.*, 2002), die Expression der Matrilin-1 mRNA wird jedoch mit zunehmender Hypertrophie der Chondrozyten herunterreguliert (Aszódi *et al.*, 1996). In Knorpelgeweben wird Matrilin-1 kontinuierlich exprimiert, während die Matrilin-3 Expression nach der Geburt eingestellt wird (Klatt *et al.*, 2002). Matrilin-3 befindet sich ausschließlich in skeletalen Geweben, Matrilin-1 ist außerhalb des Skelettsystems in geringen Mengen im Auge vorhanden (Mundlos & Zabel, 1994).

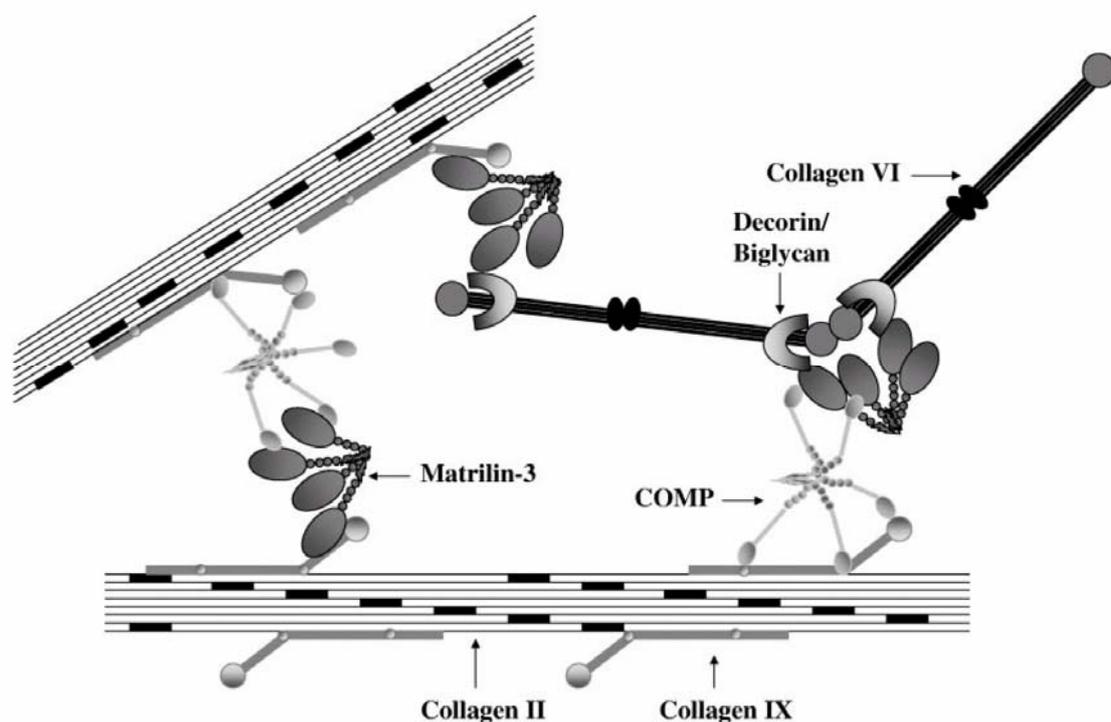
Matrilin-2 und -4 werden zwar auch in skeletalen Geweben exprimiert, sind jedoch hauptsächlich in Bindegeweben zu finden. Bei Mäusen beginnt die Matrilin-2 Expression am Tag 10,5 p. c. im Herzen, später wird es von vielen Zellen in Bindegeweben, der glatten Muskulatur und einigen Epithelien gebildet (Piecha *et al.*, 1999). In skeletalen Geweben ist es nur in geringer Menge zu finden. Matrilin-4 ist bereits ab Tag 7,5 p. c. im ektoplazentalen Kegel detektierbar, später wird es nahezu ubiquitär exprimiert. Dabei kommt Matrilin-4 in Nervengeweben in größerer Menge als die anderen Matriline vor (Klatt *et al.*, 2001). Während die Expression von Matrilin-2 eher komplementär zu der von Matrilin-1 und -3 ist, wird Matrilin-4 in allen Geweben gebildet, in denen auch eines der anderen Matriline exprimiert wird. Untersuchungen zur Gewebeverteilung der Matriline in anderen Organismen wie Mensch (Mundlos & Zabel, 1994), Huhn (Stirpe & Goetinck, 1989; Belluoccio & Trueb, 1997) und Zebrafisch (Ko *et al.*, 2005) lassen vermuten, dass die Expressionsmuster hoch konserviert sind.

### 1.1.7 Interaktionspartner und supramolekulare Assemblierung

Matriline sind in der Lage, mit vielen verschiedenen Liganden in der extrazellulären Matrix zu interagieren. So wurde Matrilin-1 in Komplexen mit Aggrekan identifiziert (Paulsson & Heinegård, 1979). Dabei wurde gezeigt, dass dafür Protein-Protein Wechselwirkungen entlang der verlängerten Chondroitinsulfat Anheftungsregion von Aggrekan verantwortlich sind und es zur Bildung nicht reduzierbarer, kovalenter Verknüpfungen zwischen dem Aggrekan *core*-Protein und Matrilin-1 kommt (Hauser *et al.*, 1996). Festphasen Interaktionsstudien von Matrilin-1, -3 und -4 (Mann *et al.*, 2004) sowie Matrilin-2 (Piecha *et al.*, 2002) ergaben, dass Matriline verschiedene Kollagene binden können, die stärksten Interaktionen wurden jedoch für Decorin und das *cartilage oligomeric matrix protein* (COMP) beobachtet. Die Matrilin-4 Interaktion mit COMP ist mit einem  $K_D$  Wert von 1 nM sehr stark, während ein monomeres Matrilin-4 Protein ohne die *coiled-coil* Oligomerisierungsdomäne deutlich schwächer mit COMP wechselwirkt (Mann *et al.*, 2004). Da für die stärkste Interaktion sowohl pentameres COMP als auch trimeres Matrilin-4 benötigt wurden, wurde postuliert, dass die Wechselwirkung kooperativ stattfindet. Eine Abspaltung einzelner Untereinheiten der Matriline mittels proteolytischer Prozessierung würde demnach die Bindungsavidität der Proteine stark beeinflussen.

Alle Matriline sind Bestandteil perizellulärer Netzwerke von Chondrozyten, die in Zellkultur gehalten werden. Matrilin-2 und -4 kommen auch in perizellulären Netzwerken anderer Zellen vor (Chen *et al.*, 1995; Piecha *et al.*, 1999; Klatt *et al.*,

2000; Klatt *et al.*, 2001). Durch Immunogold-Detektion in elektronen-mikroskopischen Aufnahmen nativ extrahierter Kollagennetzwerke wurde gezeigt, dass Matrilin-1, -3 und -4 zusammen mit den *small leucin-rich repeat* Proteoglykanen Biglykan oder Decorin in Proteinkomplexen vorkommen, die filamentöse Kollagen VI Netzwerke mit Kollagen II Fibrillen oder Aggrekan verbinden (Wiberg *et al.*, 2003). Matrilin-3 wiederum bindet an tripelhelikale Bereiche von Kollagen IX (Budde *et al.*, 2005), welches in der Regel an Kollagen II Fibrillen assoziiert ist. Daher wird von dem Modell ausgegangen, dass Komplexe aus Matrilin-3 und COMP über Kollagen IX an Kollagen II Fibrillen assoziiert sind, und diese weiterhin über Biglykan und Decorin mit Kollagen VI Mikrofibrillen verknüpfen (Budde *et al.*, 2005). Da COMP ebenfalls an Kollagen IX bindet, ist auch eine direkte Verknüpfung mehrerer Kollagen IX-haltiger, quergestreifter Kollagen II Fibrillen möglich. Matriline fungieren demnach als Adapterproteine in der extrazellulären Matrix (s. Abb. 1.6).



**Abb. 1.6: Modell der supramolekularen Assemblierung fibrillärer und filamentöser Kollagennetzwerke.** Matrilin-3 und COMP verbinden als Adaptermoleküle D-periodische Fibrillen miteinander und/oder mit Kollagen VI Filamenten und Proteoglykanen. Übernommen aus Budde *et al.*, (2005).

### 1.1.8 Matriline und menschliche Erkrankungen

Mutationen im Matrilin-3 Gen führen zu Formen von multipler epiphysärer Dysplasie (MED), bilateraler, vererbter mikro-epiphysärer Dysplasie (BHMED), Spondylo-epi-metaphysärer Dysplasie (SEMD) und Osteoarthose in der Hand. MED ist eine relativ milde Form von autosomal dominant vererbter Osteochondrodysplasie, bei der die

Ossifikation der Epiphysen verzögert und gestört ist und es zu einer verfrühten Osteoarthrose kommt. Mutationen im Matrilin-3 Gen, die MED verursachen, betreffen meistens Aminosäurereste der zentralen  $\beta$ -Faltblattstruktur der VWA Domäne (Chapman *et al.*, 2001; Jackson *et al.*, 2004; Mabuchi *et al.*, 2004). Bei BHMED sind Aminosäurereste nahe dieser Strukturen betroffen und die Erkrankung zeigt einen ähnlichen skeletalen Phänotyp wie MED (Mostert *et al.*, 2003). SEMD ist durch Anomalien der Wirbel, sowie von Epi- und Metaphysen charakterisiert und steht im Zusammenhang mit einer autosomal rezessiv vererbten Matrilin-3 Mutation, bei der ein Cysteinrest in der ersten EGF Domäne gegen einen Serinrest ausgetauscht ist (Borochowitz *et al.*, 2004). Eine weitere Mutation in der ersten EGF Domäne von Matrilin-3 kommt in Patienten mit Hand-Osteoarthrose vor (Stefansson *et al.*, 2003; Jackson *et al.*, 2004).

Eine Untersuchung der Sekretion mutierter rekombinanter Matrilin-3 Proteine voller Länge, sowie einzelner, mutierter VWA Domänen ergab, dass die Mutation, die in Zusammenhang mit Hand-Osteoarthrose steht, keinen Einfluss auf Synthese, Sekretion und Prozessierung des Proteins hatte (Otten *et al.*, 2005). Die MED- und SEMD-verursachenden Mutationen resultierten dagegen in einer Retention der Proteine im endoplasmatischen Retikulum, was wahrscheinlich zu einer Dysfunktion der Chondrozyten führen kann (Otten *et al.*, 2005; Cotterill *et al.*, 2005). Für Matrilin-1, -2 und -4 sind bislang keine Mutationen bekannt, die in einem schlüssigen Zusammenhang mit menschlichen Erkrankungen stehen.

Bei *relapsing polychondritis* handelt es sich um eine entzündliche, degenerative Erkrankung von Knorpelgeweben. Patienten mit dieser Autoimmunerkrankung besitzen Autoantikörper gegen Matrilin-1 und es ist bemerkenswert, dass sich die Krankheit in Ratten und Mäusen durch Immunisierung der Tiere mit Matrilin-1 induzieren lässt (Hansson *et al.*, 1999; Buckner *et al.*, 2000; Hansson *et al.*, 2001; Hansson *et al.*, 2004).

Weiterhin sind Matrilin potentielle Marker für Knorpelerkrankungen, die mit einem gestörten Metabolismus der Knorpelmatrix einhergehen. So werden Matrilin-1 und Matrilin-3 in osteoarthrotischem Kniegelenkknorpel, Matrilin-1 außerdem in Knie- und Hüftgelenkknorpel von Patienten mit rheumatoider Arthritis und in arthritischem Knorpel der Kiefergelenke, verstärkt exprimiert (Okimura *et al.*, 1997; Pullig *et al.*, 2002; Ohno *et al.*, 2003). Patienten mit aktiver rheumatoider Arthritis zeigen außerdem einen erhöhten Matrilin-1 Serumspiegel (Saxne & Heinegård, 1989).

Trotz dieser eindeutigen Beteiligung der Matriline bei der Pathogenese verschiedener Erkrankungen des Skelettsystems zeigten Mäuse mit einer Defizienz für Matrilin-1, -2, -3 oder -4 keinen offensichtlichen Phänotyp, was möglicherweise auf Redundanz der Proteine zurückzuführen ist (Aszódi *et al.*, 1999; Mátés *et al.*, 2004; Ko *et al.*, 2004; A. Aszódi, persönliche Mitteilung). In einer Matrilin-1-defizienten Mauslinie konnte jedoch ein leicht vergrößerter Durchmesser der Kollagen II Fibrillen beobachtet werden (Huang *et al.*, 1999). Dieser Phänotyp wurde auch bei Matrilin-1/-3-doppeldefizienten Mäusen gefunden, ansonsten zeigten die Mäuse jedoch keine offensichtlichen Entwicklungsstörungen (A. Aszódi, persönliche Mitteilung).

## 1.2 Proteolytische Prozessierung von Proteinen

Die meisten Proteine werden nach ihrer Synthese posttranslational modifiziert, damit sie ihre Funktion ausüben können. Eine sehr häufige Form von posttranslationaler Modifikation ist die proteolytische Prozessierung. Dabei handelt es sich, im Gegensatz zur Proteindegradation, um eine limitierte Proteolyse, die meist nur an einer oder wenigen spezifischen Stellen in einem Protein stattfindet. Die erste Form einer solchen proteolytischen Prozessierung ist die Abspaltung des N-terminalen Signalpeptids von Proteinen, die an Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums (ER) synthetisiert werden. Die Spaltung findet bereits während der Translokation der Proteine ins Lumen des ER statt und wird von sogenannten Signalpeptidasen katalysiert, die in der ER-Membran lokalisiert sind (Blobel, 1987). Anschließend können die Proteine z. B. durch Glykosylierung oder zusätzliche proteolytische Prozessierungen weiter modifiziert werden.

Eine proteolytische Prozessierung kann dabei funktional sehr unterschiedliche Auswirkungen auf das prozessierte Protein haben und auch erst einige Zeit nach der Synthese stattfinden. Während die proteolytische Prozessierung von Matrilin-4 wahrscheinlich in einer Modulation der Bindungsavidität des Proteins resultiert, ist sie z. B. bei vielen Proteasen notwendig, um latente Vorstufen der Enzyme in ihre proteolytisch aktiven Formen zu überführen. Die proteolytische Prozessierung von Proteinen der Plasmamembran kann z. B. dazu führen, dass Teile der cytoplasmatischen oder extrazellulären Domänen abgespalten werden. Diese können dadurch diffusibel werden und neue Funktionen ausüben. Weiterhin kann die Prozessierung von Proteinen der extrazellulären Matrix darin resultieren, dass durch die Spaltung neue Epitope entstehen und somit kryptische Bindungsstellen für weitere Proteinliganden zugänglich werden (zur Übersicht s. Schenk & Quaranta, 2003). Abgespaltene Fragmente einiger prozessierter Proteine können auch mit

Zelloberflächenrezeptoren interagieren und somit über die Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden indirekt die Genexpression der Zellen beeinflussen (Werb, 1997; Werb & Yan, 1998).

## 1.2.1 Proteolytische Enzyme

Enzyme, die Peptidbindungen hydrolytisch spalten, werden als Proteasen oder Peptidasen bezeichnet. Dabei unterscheidet man zwischen Exopeptidasen, die terminale Aminosäurereste abspalten, und Endopeptidasen, die innerhalb einer Polypeptidsequenz schneiden. Weiterhin werden Proteasen anhand ihres Katalysemechanismus klassifiziert.

Serinproteasen wie z. B. Chymotrypsin gehören zu den am besten untersuchten Enzymen überhaupt. Ihr charakteristisches Merkmal ist eine katalytische Triade aus je einem hochkonservierten Aspartat-, Histidin- und Serinrest, die in räumlicher Nähe zueinander liegen. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Hydrolyse ist ein nukleophiler Angriff des Serinrestes auf die Peptidbindung, wodurch sich ein tetraedrischer Übergangszustand bildet (zur Übersicht s. Kraut, 1977).

Cysteinproteasen, wie die meisten Cathepsine und Caspasen, funktionieren nach einem sehr ähnlichen Prinzip. Auch sie besitzen eine katalytische Triade mit einem konservierten Aspartat- und Histidinrest. Der nukleophile Angriff geht hier von einem konservierten Cysteinrest aus (Kamphuis *et al.*, 1984; Kamphuis *et al.*, 1985).

Aspartatproteasen besitzen in ihrem aktiven Zentrum keine katalytische Triade, sondern zwei deprotoniert vorliegende Aspartatreste. Ein Rest vermittelt die Deprotonierung eines Wassermoleküls, welches die Peptidbindung angreift, der andere polarisiert die Carbonylgruppe des Peptids und macht es so empfindlicher für den Angriff. Vertreter dieser Enzymklasse sind z. B. Renin, das an der Regulation des Blutdrucks beteiligt ist, das Verdauungsenzym Pepsin und die Cathepsine D und E (zur Übersicht s. Davies, 1990)

Die vierte wichtige Proteaseklasse bilden die Metalloproteasen. Bei ihnen ist ein Zinkion im aktiven Zentrum koordiniert, welches ein Wassermolekül aktiviert, das daraufhin die Peptidbindung nukleophil angreift. Ein Großteil der Metalloproteasen wird in der Metzincin-Familie zusammengefasst, die eine wichtige Rolle bei Abbau und Umbau extrazellulärer Matrices spielen. Sie besitzen ein hochkonserviertes Motiv der Sequenz HEBXHXBGBXHZ. Die drei Histidinreste koordinieren das Zinkion und liegen in Nachbarschaft einer konservierten Methioninschleife, nach der die Familie benannt wurde (Stöcker *et al.*, 1995). B (*bulky*) steht für eine Aminosäure mit großer, hydrophober Seitenkette, die Position X ist variant und anhand des Aminosäurerestes an Position Z wird zwischen den Serralysinen, Astacinen, Adamalysinen/ADAMs und

Matrixinen unterschieden. Letztere werden auch als Matrixmetalloproteasen (MMP) bezeichnet. (zur Übersicht s. Sternlicht & Werb, 2001).

### 1.2.2 Proteolytische Prozessierung in Kompartimenten des sekretorischen Transportweges

Die wohl bekannteste Familie von Proteasen des sekretorischen Transportweges sind die sieben Proproteinkonvertasen (PC) des Subtilisin Typs, mit ihrem prominentesten Vertreter Furin. Diese kalziumabhängigen Serinproteasen spalten Substrate C-terminal der minimalen Konsensussequenz K/R X<sub>n</sub> K/R (mit n=0, 2, 4 oder 6). Bei einigen Mitgliedern der PC-Familie, Furin, PC7 und PC5/6B handelt es sich um Typ I Transmembranproteine, die anderen Konvertasen PC1/3, PC2, PC4, PACE4 und PC5/6A (eine alternative Spleißvariante von PC5/6B) besitzen keine Transmembrandomänen (zur Übersicht s. Rockwell *et al.*, 2002). Sie werden als Zymogene synthetisiert und ihre Aktivierung erfolgt durch eine zweistufige, autokatalytische Abspaltung ihres N-terminalen Propeptids (Anderson *et al.*, 2002).

Proproteinkonvertasen sind primär im trans-Golgi lokalisiert, wobei die katalytische Domäne der membranständigen PCs in das Lumen gerichtet ist. PC-5/6B und SKI-1, ein enger Verwandter der Proproteinkonvertasen, sind teilweise bereits im endoplasmatischen Retikulum (ER) und frühen Golgi aktiv. Vom trans-Golgi Netzwerk werden Furin und PC-7 in einem strikt regulierten Transportzyklus über Endosomen zur Plasmamembran und wieder zurück transportiert. Dadurch können sie ihre Substrate in verschiedenen Kompartimenten des sekretorischen Transportweges und an der Zelloberfläche prozessieren (zur Übersicht s. Seidah & Prat, 2002; Thomas, 2002; Rockwell & Thorner, 2004).

Die von Furin prozessierten Substrate sind äußerst vielfältig. Zu ihnen gehören Vorstufen von Hormonen und anderen Signalmolekülen wie Proopiomelanocortin, Proinsulin und pro-BMP (*bone morphogenetic protein*)-4, aber auch Zelloberflächenrezeptoren, wie z. B. die Proformen von Notch und dem Insulinrezeptor. Weitere Substrate sind Proformen von Serumproteinen, beispielsweise Proalbumin und der Pro-von Willebrand Faktor. Durch Prozessierung viraler Glykoproteine und bakterieller Toxine wie dem Haemagglutinin des Vogel Influenzavirus H5N1 und dem Anthrax *protective antigen* spielt Furin eine wichtige Rolle bei der Pathogenese schwerer Infektionserkrankungen. Weitere, nicht weniger wichtige Substrate von Furin sind Zymogene verschiedener Metalloproteasen wie z. B. MT1-MMP (*membrane type1-MMP*) und verschiedene ADAMs (*a disintegrin and metalloproteinase*), aber auch die Vorstufe der Aspartatprotease BACE (*β-site APP cleaving enzyme*). Alle

Substrate haben gemein, dass die proteolytische Prozessierung durch Furin sie in ihre aktive Form überführt (zur Übersicht s. Rockwell *et al.*, 2002).

Eine weitere Familie von Proteasen des sekretorischen Transportweges sind die Presenilinen PS-1 und PS-2. Aufgrund ihrer Rolle bei der Prozessierung des *amyloid precursor proteins* APP, das für die Entstehung des Morbus Alzheimer verantwortlich ist, werden sie auch als  $\gamma$ -Sekretasen bezeichnet. Eine Reihe biochemischer Untersuchungen haben gezeigt, dass es sich bei ihnen höchstwahrscheinlich um Aspartatproteasen handelt, die zusammen mit anderen Proteinen in Komplexen von 250-1000 kDa vorkommen. (zur Übersicht s. Iwatsubo, 2004; Brunkan & Goate, 2005). Presenilinen sind Typ I Transmembranproteine, die vornehmlich im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind, aber auch in geringer Menge in der Plasmamembran vorkommen (de Strooper *et al.*, 1997; Kaether *et al.*, 2002). Sie prozessieren Transmembranproteine wie APP, Notch und E-Cadherin innerhalb der Transmembrandomänen. Dadurch werden die Spaltprodukte aus der Membran in das Cytosol entlassen und können dann degradiert oder in manchen Fällen in den Nukleus transloziert werden, um dort möglicherweise genregulatorische Funktionen auszuüben (s. Brunkan & Goate, 2005).

### 1.2.3 Transmembranproteasen an der Zelloberfläche

Viele Proteine der Plasmamembran und extrazellulären Matrix werden nicht unmittelbar nach der Synthese während des intrazellulären Transports proteolytisch prozessiert, sondern erst später, wenn bereits alle anderen posttranslationalen Modifikationen abgeschlossen sind und sie zu ihren jeweiligen Zielen transportiert wurden. Die Prozessierung vieler Zelloberflächen- und sezernierter Proteine wird von Proteasen katalysiert, die in der Plasmamembran sitzen.

Dazu zählen z. B. die MT-MMPs, die eine Untergruppe der Matrixine/MMPs bilden. MT1-, MT2-, MT3 und MT5-MMP besitzen im C-terminalen Bereich eine Transmembrandomäne, während MT4- und MT6-MMP über eine C-terminale GPI-(Glukophosphatidylinositol) Verankerungsdomäne mit der Plasmamembran assoziiert sind (Itoh, *et al.*, 1999; Kojima *et al.*, 2000). Weiterhin besitzen sie alle eine N-terminale Prodomäne, eine katalytisch aktive Metalloproteasedomäne und vier Hemopexin-ähnliche Domänen. Alle MT-MMPs besitzen eine Proproteinkonvertase Schnittstelle in der Prodomäne und werden während des Transports von einer Furin-ähnlichen Protease oder Plasmin proteolytisch aktiviert (Okumura *et al.*, 1997). Die MT-MMPs spalten verschiedene perizelluläre Proteine, eine wichtige Aufgabe besteht aber auch darin, andere sezernierte MMPs durch Prozessierung der Prodomänen zu aktivieren.

Ein Beispiel dafür ist MMP-2, die von allen MT-MMPs mit Ausnahme von MT4-MMP aktiviert werden kann (Strongin *et al.*, 1995; English *et al.*, 2000). Die Aktivierung erfolgt über einen einzigartigen Mechanismus, bei der die N-terminale Domäne des endogenen MMP-Inhibitors TIMP-2 (*tissue inhibitor of metalloproteinases-2*) zunächst MT1-MMP bindet und inhibiert. Anschließend interagiert die C-terminale Domäne von TIMP-2 mit der Hemopexin Domäne von pro-MMP-2, wodurch diese an der Membran festgehalten wird. Ein zweites, nicht inhibiertes MT1-MMP Molekül spaltet dann in der Prodomäne von MMP2. Zur vollständigen Aktivierung des prozessierten pro-MMP2 Proteins wird ein verbleibender Rest der Prodomäne von einem anderen, bereits aktiven MMP2 Molekül abgespalten (Zucker *et al.*, 1998; Deryugina *et al.*, 2001). Möglicherweise besitzen MT-MMPs ein wesentlich breiteres Funktionsspektrum als zunächst angenommen. Golubkov *et al.* (2005) konnten zeigen, dass MT1-MMP in Endosomen entlang des Tubulin-Zytoskeletts zu den Centrosomen wandern kann und dort das centrosomale Protein Pericentrin spaltet. Dies führt letztendlich zu einer Instabilität der mitotischen Spindel.

Eine weitere Form der proteolytischen Prozessierung, die von Proteasen der Zelloberfläche katalysiert wird, nennt man *shedding* (Abscheren). Darunter versteht man das Abspalten nahezu vollständiger Ektodomänen transmembraner Proteine. Etwa 2-4% aller Zelloberflächenproteine werden durch *shedding* modifiziert, darunter strukturell und funktional vollkommen unterschiedliche Proteine wie TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ), Liganden des EGF Rezeptors (EGFR), APP und die Kollagene XIII und XVII (Schäcke *et al.*, 1998; Snellman *et al.*, 2000; zur Übersicht s. Blobel, 2005). Die Konsequenzen des *shedding* von Ektodomänen sind ebenfalls sehr vielfältig. Einerseits dient es der Inaktivierung von Zelloberflächenrezeptoren, wobei die abgespaltenen Ektodomänen als lösliche Köder Rezeptorliganden in der Matrix abfangen könnten. Andererseits können die durch *shedding* freigesetzten Ektodomänen als lösliche Proteine wichtige zellbiologische Vorgänge steuern. Die Ektodomäne des Adhäsionsproteins Kollagen XIII beeinflusst z. B. Adhäsion, Migration und Proliferation von Zellen (Väisänen *et al.*, 2004), während *shedding* von EGFR-Liganden darin resultiert, dass lösliche Ektodomänen als parakrines Signal in weiter Entfernung wirken können. Die ungespaltenen Membranproteine können hingegen nur autokrin oder an direkt benachbarte Zellen wirken (s. Blobel, 2005).

*Shedding* kann von unterschiedlichen Proteasen katalysiert werden. Für Kollagen XIII, Kollagen XXIII und andere Transmembranproteine wurde gezeigt, dass sie von Proproteinkonvertasen wie Furin gespalten werden (Banyard *et al.*, 2003; Väisänen *et*

*al.*, 2004), während das *shedding* des membranverankerten Proteoglykans Betaglykan, einem Interaktionspartner von TGF- $\beta$ , von MT1-MMP durchgeführt wird (Velasco-Loyden *et al.*, 2004).

In vielen Fällen sind jedoch transmembrane Metalloproteasen der ADAM (*a disintegrin and metalloproteinase*) Familie beteiligt, die hauptsächlich mit *shedding* in Verbindung gebracht werden (s. Blobel, 2005). Dabei handelt es sich eine große Proteinfamilie mit modularer Struktur. Sie alle besitzen eine N-terminale Prodomäne, eine Metalloproteasedomäne, eine Disintegrin-ähnliche Domäne, eine Cystein-reiche Domäne, EGF Domänen, eine Transmembrandomäne und einen C-terminalen cytoplasmatischen Schwanz. Die wichtigen Aminosäuren des Zink-bindenden Motivs der Metalloproteasedomäne sind jedoch nur bei 17 der 30 bekannten ADAMs konserviert (zur Übersicht s. Primakoff & Myles, 2000; Sternlicht & Werb, 2001). Sie sind strukturell eng mit den Disintegrinen, Schlangengiftproteasen der Adamalysin-Familie, verwandt. Im Gegensatz zu den Adamalysinen besitzt mit Ausnahme von humanem ADAM-15 kein bekannter Vertreter der ADAM-Familie das konservierte Integrin-Bindemotiv RGD. ADAMs werden entweder von Proproteinkonvertasen oder autokatalytisch im trans-Golgi Netzwerk aktiviert (Roghani *et al.*, 1999; Schlomann *et al.*, 2002) und sind über Transmembrandomänen in der Plasmamembran verankert. ADAM-17 (TACE, *TNF- $\alpha$  converting enzyme*), ADAM-9 und ADAM-10 sind die bestuntersuchten Proteasen der ADAM-Familie. Da sie die Ektodomäne von APP abspalten und damit in der Pathogenese der Alzheimerschen Krankheit involviert sind, werden sie auch als  $\alpha$ -Sekretasen bezeichnet (Buxbaum *et al.*, 1998; Lammich *et al.*, 1999; Koike *et al.*, 1999). Wie die Proproteinkonvertasen und die MT-MMPs sind auch die ADAMs in der Lage, viele verschiedene Substrate zu prozessieren, unter anderem Notch und Kollagen XVII (Hartmann *et al.*, 2002; Franzke *et al.*, 2002; s. Blobel, 2005).

### 1.2.3 Sezernierte Proteasen der extrazellulären Matrix

Die extrazelluläre Matrix ist einem stetigen Metabolismus unterworfen, wobei ein ausgefeiltes Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau der Komponenten vorliegt. Eine Störung dieses Gleichgewichtes führt oft zu schweren Erkrankungen, wie zum Beispiel zu Osteoarthritis, bei der die Symptome durch eine exzessive Degradation der extrazellulären Matrix des artikulären Knorpels verursacht werden. Aber auch im gesunden Organismus müssen extrazelluläre Matrices während der Morphogenese von Geweben ständig umstrukturiert werden, um zelluläre Prozesse wie z. B. Proliferation, Adhäsion und Migration zu ermöglichen. Der vollständige Abbau von Proteinen der extrazellulären Matrix findet teilweise in Lysosomen statt, wofür die

Proteine zunächst phagozytiert werden müssen, kann aber auch bereits in der Matrix durchgeführt werden. Osteoclasten beispielsweise sezernieren lysosomale Cathepsine, die ihre Substrate in Lakunen im perizellulären Raum degradieren. Da diese Proteasen vornehmlich im sauren Milieu aktiv sind, werden die Lakunen von ATPasen der Plasmamembran angesäuert (zur Übersicht s. Goto *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004).

Viele strukturelle Proteine der extrazellulären Matrix sind jedoch fest in großen Proteinkomplexen verankert und müssen daher zunächst von sezernierten Proteasen durch limitierte Proteolyse prozessiert werden. Das resultiert in der Regel in der Abspaltung löslicher Untereinheiten und Peptide. Diese können dann entweder phagozytiert und weiter degradiert werden oder eine Vielzahl neuer Funktionen ausüben, ähnlich wie die durch *shedding* freigesetzten Ektodomänen membranständiger Proteine.

Der Großteil sezernierter Proteasen gehört zu drei Proteasefamilien, den ADAMTS (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*), MMPs und Kallikreinen. Im Menschen existieren 19 ADAMTS-Gene. Sie sind eng mit den ADAMs verwandt, besitzen jedoch keine Transmembrandomäne. ADAMTSs bestehen aus einer N-terminalen Prodomäne, einer Metalloproteasedomäne mit konserviertem Zink-Bindungsmotiv, einer Disintegrin-ähnlichen Domäne, einer zentralen TS (Thrombospondin Typ I-ähnlichen) Domäne, einer *spacer*-Sequenz variabler Länge und einer unterschiedlichen Anzahl C-terminaler TS Domänen. Einige ADAMTS Proteasen besitzen noch weitere Domänen im C-terminalen Bereich (zur Übersicht s. Porter *et al.*, 2005). Ein funktionaler Unterschied zwischen ADAMTSs und MMPs besteht darin, dass ADAMTS-Proteasen Proteine der extrazellulären Matrix binden können, wobei die Bindung zwischen den C-terminalen TS Domänen und sulfatierten Glukosaminoglykaseitenketten von Proteoglykanen wie Aggrekan stattfindet (Kuno & Matsushima, 1998). Die Aktivierung erfolgt wie bei den ADAMs durch proteolytische Prozessierung der Prodomänen durch Proproteinkonvertasen im trans-Golgi. Einige ADAMTSs können auch in der C-terminalen *spacer*-Region prozessiert werden. ADAMTS-4 verliert dadurch z. B. seine Verankerung in der Matrix und hat ein verändertes Aktivitätsprofil (Gao *et al.*, 2002). Zu den bekannten Substraten von ADAMTSs gehören Proteoglykane wie Aggrekan, Brevikan und Versikan sowie der von Willebrand Faktor. ADAMTS-2, ADAMTS-3 und ADAMTS-14 prozessieren die N-terminalen Propeptide von Kollagen I, II und III und sind somit an der Fibrillogenese dieser Kollagene beteiligt (s. Porter *et al.*, 2005).

Die zweite Hauptfamilie sezernierter Proteasen bilden die MMPs (s. Sternlicht & Werb, 2001). Sie haben prinzipiell die gleiche modulare Struktur wie die MT-MMPs, es fehlt ihnen jedoch die C-terminale Transmembrandomäne bzw. die GPI-Verankerungssequenz. Einige der 25 bis dato in Vertebraten identifizierten MMPs besitzen noch weitere Domänen, die teilweise die Hemopexin-ähnlichen Domänen ersetzen. (s. Sternlicht & Werb, 2001) Wie auch die meisten anderen Proteasen werden MMPs als Zymogene synthetisiert. Die Latenz wird durch eine ungepaarte Cystein-Sulfhydrylgruppe in der C-terminalen Propeptid-Domäne aufrechterhalten, welche eine vierte Bindung mit dem Zink-Ion des aktiven Zentrums eingeht. MMP-11 und MMP-27 werden bereits intrazellulär von Furin aktiviert, die Prodomänen der anderen MMPs werden erst in der Matrix entweder von bereits aktiven MMPs, sezernierten Serinproteasen oder membranständigen MT-MMPs abgespalten. MMPs spalten eine Vielfalt struktureller Matrixproteine wie Kollagene (z. B. Typ I-XII), Proteoglykane (z. B. Aggrekan) und nicht-kollagene Proteine (z. B. Laminin, Fibronectin) und aktivieren sich gegenseitig durch Prozessierung der Prodomänen (s. Sternlicht & Werb, 2001).

Die dritte Gruppe sezernierter Proteasen der extrazellulären Matrix sind die Kallikreine. Dabei handelt es sich um sezernierte Serinproteasen, die aus einer N-terminalen Prodomäne und einer C-terminalen Serinproteasedomäne bestehen. Humanes Kallikrein-3 (hK3, Prostata-spezifisches Antigen, PSA) wird schon seit langem als diagnostischer Indikator für Prostatakrebs verwendet, daher sind die fünfzehn humanen Kallikreine (hKs) weitaus besser untersucht als ihre murinen Homologe. Bei Kallikreinen erfolgt die Aktivierung durch proteolytische Prozessierung entweder während des Transports oder extrazellulär. Dies kann sowohl autokatalytisch, durch andere Kallikreine, andere Serinproteasen und Metalloproteasen geschehen (zur Übersicht s. Borgoño & Diamandis, 2004). Die Inaktivierung erfolgt durch eine Spaltung in der Proteasedomäne, die ebenfalls autokatalytisch erfolgen kann oder durch andere Serinproteasen vermittelt wird. Kallikreine können aber auch von Serpinen, einer Familie endogener Inhibitoren von Serinproteasen, irreversibel gehemmt werden. hK2 und hK3 werden weiterhin von  $Zn^{2+}$  allosterisch inhibiert (Lovgren *et al.*, 1999; Malm *et al.*, 2000). Auch wenn sich Kallikreine in Struktur und Spaltmechanismus deutlich von den sezernierten Metalloproteasen der ADAMTS- und MMP-Familien unterscheiden, scheinen sie ebenso vielfältige Substrate und ähnliche Funktionen zu haben. hK1 aktiviert z. B. pro-MMP2 und pro-MMP9, hK2 aktiviert die Zymogene von hK3 und ADAMTS-8 und spaltet Fibronectin, hK3 kann TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ) durch proteolytische Spaltung aktivieren und hK6 ist durch Spaltung von

Matrixproteinen wie Kollagen I, Kollagen IV und Laminin an der Degradation der extrazellulären Matrix beteiligt (s. Borgoño & Diamandis, 2004).

### 1.2.4 Regulation der Expression und Aktivität von Proteasen

Die fortschreitenden Untersuchungen der transmembranen und sezernierten Proteasen zeigen, dass sie in Bezug auf ihre vielfältigen Substrate und Funktionen eine hohe Redundanz aufweisen. Da die spezifischen proteolytischen Aktivitätsmuster in der peri- und extrazellulären Matrix eines Gewebes durch Prozessierung und Degradation der Matrixkomponenten einen bedeutenden Einfluss auf das Schicksal eines Gewebes haben können, sind räumliche und zeitliche Expression, sowie die Aktivität der Proteasen, strikt reguliert. Einige Proteasen wie z. B. Furin werden mehr oder weniger ubiquitär exprimiert, andere nur in einzelnen Geweben oder während bestimmter entwicklungsbiologischer Stadien (s. Rockwell *et al.*, 2002).

Auch die Aktivität der meisten Proteasen kann auf mehreren Ebenen reguliert werden. Alle Proteasen besitzen Prodomänen, die sie in einem latenten Zustand halten und zur Aktivierung der Proteasen proteolytisch entfernt werden müssen. Bei vielen Proteasen wie den ADAMs geschieht dies bereits während des Transports autokatalytisch oder durch Furin (s. Blobel, 2005). Für die Aktivierung einiger Proteasen sind jedoch komplexe proteolytische Kaskaden notwendig. So kann z. B. MMP-9 von MMP-13 aktiviert werden (Knäuper *et al.*, 1996). MMP-13 wiederum wird von MT1-MMP im Zusammenspiel mit TIMP-2 aktiviert, und MT1-MMP von Furin (Knäuper *et al.*, 1996, Cowell *et al.*, 1998; zur Übersicht s. Nagase, 1997; Stamenkovic, 2000). Eine weitere Möglichkeit der Regulation der Proteaseaktivität ist durch gewebespezifische Inhibitoren wie TIMPs, Serpine und das Serumprotein  $\alpha$ 2-Makroglobulin gegeben (s. Sternlicht & Werb, 2001; Borgoño & Diamandis, 2004). Außerdem besitzen viele Transmembranproteasen cytoplasmatische Domänen, die durch Wechselwirkungen mit intrazellulären Liganden die proteolytische Aktivität beeinflussen können (s. Blobel, 2005). Letzten Endes wird die Aktivität auch durch den Abbau der Proteasen gesteuert.

Nicht nur Expression und Aktivität der Proteasen können reguliert werden, sondern auch deren Substratspezifitäten. Zum einen kann dies durch posttranslationale Modifikationen wie proteolytische Prozessierung geschehen. So verändert z. B. die C-terminale Prozessierung von ADAMTS-4 das Aktivitätsprofil des Enzyms (Gao *et al.*, 2002; s. Porter *et al.*, 2005). Da von vielen Proteasen alternative Spleißvarianten mit möglicherweise unterschiedlichen Bindungseigenschaften existieren, besteht hier ebenfalls eine Regulationsmöglichkeit auf transkriptioneller Ebene. Im Menschen existieren beispielsweise 15 Kallikrein-kodierende Gene mit insgesamt mindestens 82

verschiedenen Transkripten (zur Übersicht s. Borgoño *et al.*, 2004). Weiterhin ist die Substratspezifität einer Protease auch indirekt von der Zugänglichkeit des Substrats abhängig, da viele Proteine der extrazellulären Matrix in großen Proteinkomplexen fest verankert sind. Bevor beispielsweise Kollagenfibrillen in der Matrix von osteoarthrotischem Knorpel degradiert werden, sind prozessierte Fragmente des Kollagen-assoziierten Proteins Fibromodulin nachweisbar, die durch MMP-13 Spaltung entstehen (Billinghurst *et al.*, 2000; Heathfield *et al.*, 2004). Möglicherweise sind die Kollagenfibrillen erst nach der Proteolyse Kollagen-assoziiertes Proteine wie Fibromodulin für Kollagenasen zugänglich.

## 1.3 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war eine umfassende Charakterisierung der proteolytischen Prozessierung der Matrilin. Dazu sollten alle Matrilin als rekombinante Fusionsproteine mit C-terminaler Markierung in menschlichen 293EBNA Zellen exprimiert werden, um Matrilin-1 und -2 auf proteolytische Prozessierung zu untersuchen und die Prozessierung von Matrilin-3 und -4 weitergehend zu charakterisieren. In Ergänzung zu bereits bekannten Daten sollte das heterogene Erscheinungsbild der Matrilin im Gewebe beschrieben werden. Außerdem sollten mögliche Ursachen der Heterogenität untersucht werden.

Durch die Expression und Analyse rekombinanter Matrilin mit verschiedenen Mutationen in der Scharnierregion sollte untersucht werden, ob die Matrilin-4 Proteaseschnittstelle auch in anderen Matrilin konserviert ist und welche strukturellen Faktoren die Prozessierung beeinflussen können.

Um weiterhin den Mechanismus der proteolytischen Prozessierung von Matrilin-4 zu charakterisieren, sollte in verschiedenen Experimenten untersucht werden, wann und wo die Spaltung stattfindet. Zusätzlich sollten Proteasen identifiziert werden, die Matrilin-4 spalten können und/oder an der Prozessierung in der C-terminalen Scharnierregion beteiligt sind.

Die proteolytische Prozessierung von Matrilin-4 im Gewebe sollte mittels Schnittstellen-spezifischer Neo-Epitop Antikörper untersucht werden. Die Antikörper sollten hergestellt, charakterisiert und affinitätsgereinigt werden, um sie anschließend zum Nachweis *in vivo* prozessierter Matrilin-4 Fragmente einzusetzen

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme entsprachen dem Qualitätsstandard *pro analysi* und wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Biozym (Oldendorf), FLUKA (Milwaukee, USA), Gerbu (Gaiberg), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen) und NEB (New England Biolabs; Beverly, USA) erworben. Zellkulturmedien und deren Zusatzstoffe wurden von GibcoBRL/Life Technologies (Paisley, Schottland) bezogen. Sämtliche Lösungen, Puffer und Reaktionen wurden in vollentsalztem Wasser oder hochreinem, deionisiertem Wasser (MilliQ Biocel System, Millipore) angesetzt. Angegebene pH - Werte beziehen sich auf Raumtemperatur (RT). Hitzebeständige Lösungen, Plastik- und Glasgegenstände wurden 40 min bei 121°C autoklaviert, Glaspipetten und Metallgegenstände wurden 6h bei 180°C sterilisiert. Sämtliche Arbeiten wurden, soweit nicht anders angegeben, nach Sambrook *et al.* (1989) oder nach Herstellervorschrift durchgeführt.

#### 2.1.1 Allgemeine Lösungen und Puffer

6 x DNA Auftragspuffer	0,25% (w/v) Bromphenolblau oder Xylencyanol 70% (v/v) Glycerin
PBS	140 mM NaCl 10 mM KCl 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4
SDS-PAGE Auftragspuffer	2% (w/v) SDS 10% (v/v) Glycerin 0,04% (w/v) Bromphenolblau 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8
SDS-PAGE Elektrophoresepuffer	200 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS 25 mM TrisHCl, pH 8,3
TAE	40 mM Tris 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA

TBS	150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl (pH 7,4)
TBST	150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) 0,01% (v/v) Tween 20
TBSTX	150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) 0,1% Triton X-100

### 2.1.2 Nährmedien für Bakterien

Luria-Bertani (LB) Medium und LB Agar wurden nach Herstellerangaben (GibcoBRL, Life Technologies) angesetzt und autoklaviert. Bei Bedarf wurde Ampicillin (Amp) in einer Endkonzentration von 50 µg/ml in Medien und Agar eingesetzt.

LB-Medium:     1% (w/v) NaCl  
                  0,5% (w/v) Hefe-Extrakt  
                  0,5% (w/v) Pepton

LB-Agar:        1,5% Agar in LB-Medium

### 2.1.3 Bakterienstämme

Es wurde mit zwei unterschiedlichen Stämmen des Darmbakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*) gearbeitet:

XL-I Blue MRF' (Stratagene):

Genotyp:  $\Delta$ (mrcA) 183,  $\Delta$ (mrcCB, hsdSMR –mrr) 173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac[F'proAB, lacI<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15, Tn10 (tet<sup>r</sup>)]

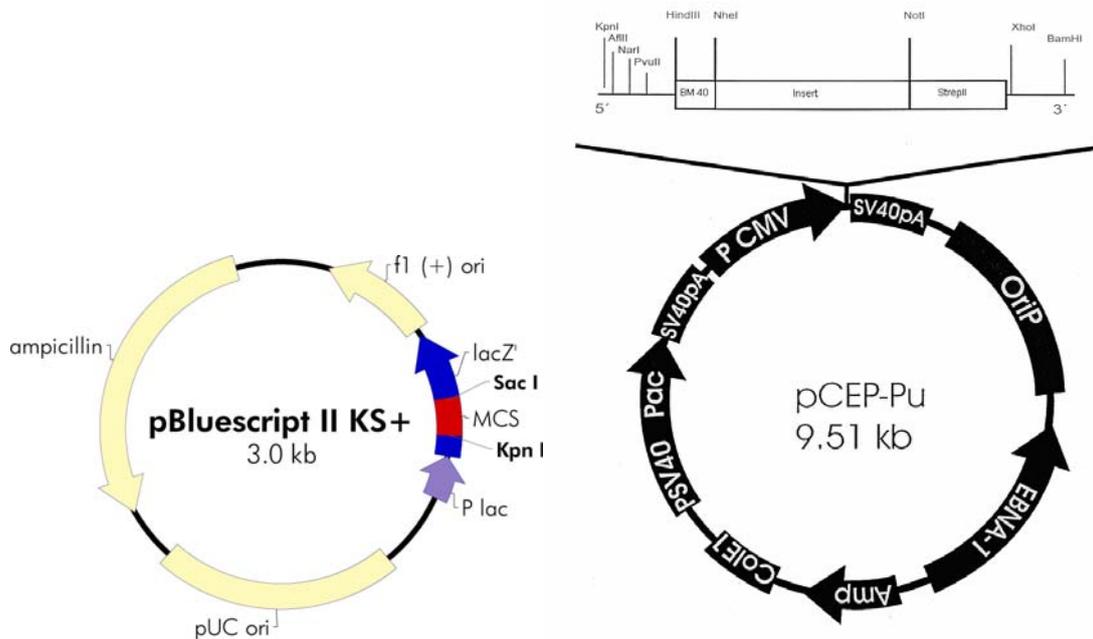
DH5 $\alpha$  (Invitrogen):

Genotyp: F-,  $\Phi$ 80, lacZ $\Delta$ M15,  $\Delta$ (lacZYA-argF) U169, recA1, endA1, hsdR17 (rK-, mK+), phoA, supE44,  $\lambda$ -, thi-1, gyrA96, relA1,  $\lambda$ -

### 2.1.4 Klonierungs- und Expressionsvektoren

Klonierungsarbeiten und *in vitro* Mutagenese wurden im Klonierungsvektor pBluescript II KS (Stratagene, s. Abb. 2.1) durchgeführt. Zur Transfektion und rekombinanten Expression von Proteinen in eukaryotischen 293EBNA Zellen wurden zwei Varianten des Expressionsvektors pCEP-Pu (Kohfeldt *et al.*, 1997) verwendet. Dieser enthält im 5'-Bereich der Klonierungsstelle die Sequenz für das Signalpeptid des BM40 Proteins.

Die Variante C-strep enthält im 3'-Bereich der multiplen Klonierungsstelle die Sequenz für eine C-terminale StrepII-Markierung (s. Abb. 2.1), die Variante V27 für eine C-terminale His<sub>8</sub>-Markierung. pCEP-Pu V27 wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Koch.



**Abb. 2.1: Karten der verwendeten Vektoren.** Links: Klonierungsvektor pBluescript II KS (Stratagene), rechts: Expressionsvektor pCEP-Pu mit Ausschnitt der Klonierungsstelle der Variante C-Strep. MCS = multiple Klonierungsstelle, BM40 = Sequenz des Signalpeptids von BM 40, StrepII = Sequenz der StrepII-Markierung.

### 2.1.5 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden entweder von Sigma Genosys (Pampisford, UK) oder Invitrogen synthetisiert.

**Tab. 2.1: Verwendete Oligonukleotide**

m4dA1fw:	5'-GCCCACTAGTAAAGGACCTGTGTGCTGAGTTGG-3'
m4dA1rev:	5'-CAATGGATCCCTTTTCGGCTAGCCAGCTGG-3'
m4dA1hrm1s:	5'-TCTCAAAGGCAGCATATGCCAGAGGAGGACCCCTGCGAATGCGAAAGCC-3'
m4dA1hrm1as:	5'-GGCTTTTCGCATTTCGAGGGGTCCTCCTCTGGGCATATGCTGCCTTTGAGA-3'
m4dA1hrm1Qs:	5'-TCTCAAAGGCAGCATATGCCACAGCAGGACCCCTGCGAATGCGAAAGCC-3'
m4dA1hrm1Qas:	5'-GGCTTTTCGCATTTCGAGGGGTCCTGCTGTGGGCATATGCTGCCTTTGAGA-3'
matm412	5'-GCTCTGTAGCCGCACCTCTG-3'
matm421	5'-CTTCTCCCATCAGGTAGCAG-3'
matm45	5'-AACCATCCACCAGGAGAACAAG-3'
matm451:	5'-AGATTGTGGATTTCTTGACG-3'
T3	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'
T7	5'-GCCCTATAGTGAGTCGTATTAC-3'
NRS-Oligo(dT)	5'-AAGGATCCGACATCGATAATACGACTCACTATAGGGATTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

### 2.1.6 DNA-Längenstandard und Protein-Molekulargewichtsstandards

Folgende Längen- bzw. Molekulargewichtsstandards wurden als Referenz bei Agarosegelelektrophoresen und SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen verwendet:

DNA-Längenstandard:	1kb DNA-Ladder (Life Technologies)
Protein-Molekulargewichtsstandards:	Low Molecular Weight Marker (Amersham Pharmacia)
	High Molecular Weight Marker (Roche)
	Broad Range Marker (NEB)

### 2.1.7 Antikörper

**Tab. 2.2: In dieser Arbeit verwendete Primärantikörper.** BTC = boviner Tracheaknorpel, IB = Immunoblot, IF = Immunfluoreszenz, m = Maus, ra = Kaninchen, PDI = Proteindisulfidomerase, PP2A = Proteinphosphatase 2A, n. p. = nicht publiziert

Antigen /Bezeichnung	Spezies	Anbieter/Referenz	Verd. IB	Verd. IF
GM130	m (monoklonal)	BD Biosciences	1:250	-
Matrilin-1 BTC-1	ra (polyklonal)	N. Hauser, n. p.	1:500	-
Matrilin-1 ΔCT	ra (polyklonal)	diese Arbeit	1:500	-
Matrilin-2	ra (polyklonal)	F. Deák, n. p.	1:500	-
Matrilin-3 ΔCT	ra (polyklonal)	Klatt <i>et al.</i> , 2000	1:500	-
Matrilin-4	ra (polyklonal)	Klatt <i>et al.</i> , 2001	1:500	1:400
Matrilin-4 pC	ra (polyklonal)	diese Arbeit	1:500	1:200
PDI	m (monoklonal)	Stressgen Bioreagents	1:1000	-
PP2A	ra (polyklonal)	Santa Cruz	1:1000	-
StreptII-Markierung	ra (polyclonal)	IBA	1:1000	-

**Tab. 2.3: Verwendete Sekundärantikörper.** HRP = Meerrettichperoxidase, IB = Immunoblot, IF = Immunfluoreszenz

Antigen	Typ	Anbieter	Anwendung/Verdünnung
Kaninchen IgG	HRP-konj.	Dako	IB 1:2500
Maus IgG	HRP-konj.	Dako	IB 1:3000
Meerschweinchen IgG	HRP-konj.	Sigma	IB 1:1000
Kaninchen IgG	Alexa-488	Molecular Probes	IF 1:1000

## 2.2 Allgemeine molekularbiologische Arbeiten

### 2.2.1 Herstellung und Lagerung von Bakterienkulturen

Zur Herstellung von Einzelkolonien wurden E. coli Bakterien auf einer LB-Agarplatte (mit oder ohne Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank (Heraeus, Typ B5050 E, Heraeus Instruments) inkubiert. Anschließend wurden Einzelkolonien in 5 ml LB-Medium (mit oder ohne Ampicillin) angeimpft und für 8-16 Stunden bei 37°C mit 200-250 U/Min geschüttelt.

Zur längerfristigen Lagerung wurden Bakterienkulturen mit 0,1 Volumen (Vol) Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren und gelagert.

### 2.2.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

1 ml einer Kultur von E. coli Bakterien vom Typ XL-I Blue oder DH5α wurden in 100 ml LB-Medium angeimpft und 2-3h bei 37°C und 220 U/min inkubiert, bis die Kultur bei einer Wellenlänge von 600 nm eine optische Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,5 erreicht hatte. Anschließend wurde die 100 ml Kultur auf zwei sterile 50 ml Falcon-Röhrchen (Greiner) aufgeteilt, die Bakterien 15 min auf Eis gekühlt und danach 15 min bei 1200 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten Bakterien in 33 ml RF I resuspendiert. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurde erneut 15 min bei 1200 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Bakterien in 8 ml RF II (s. u.) resuspendiert. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis wurde die Bakterienlösung bei 4°C aliquotiert und bei -80°C eingefroren und gelagert.

RF I:	100 mM RbCL	RF II:	10 mM MOPS
	50 mM MnCl <sub>2</sub>		10 mM RbCl
	30 mM KAc		75 mM CaCl <sub>2</sub>
	10 mM CaCl <sub>2</sub>		15% (v/v) Glycerin
	15% (v/v) Glycerin		

### 2.2.3 Transformation von Bakterien durch Hitzeschock

Zur Transformation mit rekombinanter Plasmid-DNA wurden transformationskompetente XL-I Blue oder DH5α Bakterien auf Eis aufgetaut und 10-100 ng gereinigte Plasmid-DNA zugefügt. Nach erneuter 25 minütiger Inkubation der Bakterien auf Eis wurden sie im Wasserbad oder Heizblock 90 s bei 42°C inkubiert und anschließend 2 min auf Eis abgekühlt. Danach wurden 400 µl LB-Medium hinzugefügt, die Suspension 1h bei 37°C inkubiert, jeweils 10 und 100 µl der Suspension auf LB-Amp Agarplatten ausplattiert und 14-20h bei 37°C inkubiert.

### 2.2.4 DNA-Präparation aus Bakterienkulturen

Für eine Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien wurden 2 ml einer Bakterienkultur 1 min bei 12000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Plasmid-DNA der Bakterienkultur wurde mit dem Kit „NukleoSpin Plasmid“ nach Herstellervorschrift isoliert. Wenn nötig wurde der Resuspensionspuffer zuvor mit 0,1 mg/ml DNase-freier RNase versetzt. Dazu wurde RNase A aus Rinderpankreas zu einer Konzentration von 10 mg/ml in 10 mM NaAc (pH 5,2) gelöst und 15 min auf 100°C erhitzt. Nach langsamer Abkühlung auf RT wurde anschließend der pH-Wert durch Zugabe von 0,1 Vol 1 M Tris-HCl (pH 7,4) wieder neutralisiert.

### 2.2.5 DNA-Präzipitation

Zur Präzipitation von DNA in einer Lösung wurde diese mit 0,1 Vol 3 M NaAc (pH 5,2) und 2 Vol. eiskaltem Ethanol (96% v/v) versetzt und 30 min bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA 10 min bei 4°C und 12000 x g abzentrifugiert, in 0,5 ml 70% (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (2 min, 4°C und 12000 x g). Der Überstand wurde verworfen, die sedimentierte DNA bei RT getrocknet und anschließend wieder in H<sub>2</sub>O oder 5 mM Tris (pH 8,0) gelöst.

### 2.2.6 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA in Lösungen wurde photometrisch bestimmt. Bei durchschnittlicher Basenverteilung und 1 cm Schichtdicke gilt für doppelsträngige DNA (dsDNA) bei einer Wellenlänge von 260 nm:  $\epsilon_{\text{dsDNA}} = 0,05\mu\text{g}^{-1} \times \text{ml} \times \text{cm}^{-1}$ . Das Verhältnis der  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  beträgt für reine DNA 1,8-2. Die Absorption bei 320 nm wurde zur Korrektur von Messwerten abgezogen.

### 2.2.7 Agarosegelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde 0,7-2,5% (w/v) Agarose (Seakem) in TAE durch Aufkochen vollständig gelöst und nach kurzer Abkühlzeit Ethidiumbromid (ad 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) hinzugegeben. Anschließend wurde das flüssige Gel in eine Laufkammer gegossen. Die eingesetzte Agarosekonzentration richtete sich nach der erwarteten Größe der DNA-Fragmente

Die aufzutrennende DNA-Lösung wurde mit 1/6 Vol 6x DNA-Auftragspuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die angelegte Spannung betrug 4-8 Volt/cm. Die Ethidiumbromid-gefärbte DNA wurde anschließend durch UV-Licht in den Gelen sichtbar gemacht.

### 2.2.8 Elution von DNA aus Agarosegelen und Aufreinigung aus Lösungen

DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell bei UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und mittels des Kits „UltraClean15“ (Macherey und Nagel) aus der Agarose eluiert oder aus Lösungen aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit H<sub>2</sub>O oder 5 mM Tris-HCl pH 8.

### 2.2.9 Restriktionsspaltung von DNA

Die Restriktionsspaltung von DNA wurde mit Restriktionsenzymen der Firma NEB durchgeführt, wozu jeweils die vom Hersteller empfohlenen Puffer verwendet wurden. Restriktionsverdau wurden folgendermaßen angesetzt und für 1-4 h bei 37°C inkubiert:

1 µg DNA  
2 µl 10x Restriktionsenzym-Puffer (NEB)  
0,2 µl 100x BSA (NEB) (falls notwendig)  
2-10 U Restriktionsenzym  
ad 20 µl H<sub>2</sub>O

Bei Restriktionsverdau mit mehreren Restriktionsenzymen wurde der für die jeweiligen Doppelverdau vom Hersteller empfohlene Puffer verwendet. War dies nicht möglich, so wurde das zuerst verwendete Enzym 20 min bei 65°C inaktiviert, die Pufferbedingungen dem nachfolgenden Enzym angepasst und erneut geschnitten. Wurde mit Enzymen geschnitten, die nicht hitzeinaktivierbar waren, so wurde die DNA nach dem Verdau elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend aus der Agarose eluiert.

### 2.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmide wurde zu ca. 25 ng geschnittener Vektor-DNA der 3-5 fache molare Überschuss des geschnittenen DNA-Fragments gegeben. Sollten zwei DNA-Fragmente miteinander ligiert werden, so wurden sie in einem molaren Verhältnis von 1:1 eingesetzt. Ligationen wurden folgendermaßen angesetzt und 1-2 h bei RT oder 16 h bei 16°C inkubiert:

Insgesamt 50-150 ng DNA  
1 µl 10x T4-DNA-Ligasepuffer (NEB)  
5-10 U T4-DNA-Ligase (NEB)  
ad 10 µl H<sub>2</sub>O

### 2.2.11 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wurde entweder zu analytischen Zwecken oder präparativ zur Klonierung rekombinanter Konstrukte angewendet. Zur analytischen PCR wurden geringe Mengen Vorlage-DNA in Lösung oder Einzelkolonien von Bakterien eingesetzt und die erwünschten DNA-Fragmente in bis zu 42 Zyklen mit der AmpliTaq-Polymerase (Perkin Elmer) amplifiziert, während zur Vermeidung von Mutationen bei präparativen PCRs mehr Vorlage-DNA eingesetzt wurde damit weniger Zyklen zur Amplifikation der DNA-Fragmente notwendig waren. Außerdem wurde bei präparativen PCRs das „Expand High Fidelity PCR System“ (Roche) verwendet, da die Enzyme dieses Systems im Gegensatz zur Taq-Polymerase eine Korrekturlesefunktion besitzen. Die Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide richtete sich nach deren optimaler Hybridisierungstemperatur und die Elongationszeit nach der Länge des zu erwartenden PCR-Produktes.

#### Analytische PCR:

Ansatz: 1-20 ng	DNA oder 1 Bakterien Einzelkolonie
0,5 µl	5'-Oligonukleotid [10 µM]
0,5 µl	3'-Oligonukleotid [10 µM]
0,2 µl	dNTP Mix [25 µM]
2,5 µl	10x AmpliTaq Puffer (Perkin Elmer)
5 U	AmpliTaq (Perkin Elmer)
ad 25 µl	H <sub>2</sub> O

Temperaturprogramm:	a) 5 min 94°C	Denaturieren der DNA (und Bakterienaufschluss)
	b) 15 sek 94°C	Denaturieren der DNA
	c) 30 sek 45-65°C	Anlagern der Oligonukleotide.
	d) 30-90 sek 72°C	Elongation
	e) 40-72 x	Wiederholung der Schritte b), c) und d)
	f) 7 min 72°C	abschließende Elongation

#### Präparative PCR:

Ansatz: 100 ng	DNA
0,5 µl	5'-Oligonukleotid [10 µM]
0,5 µl	3'-Oligonukleotid [10 µM]
0,2 µl	dNTP Mix [25 µM]
2,5 µl	10x Expand HF Puffer (15 mM MgCl <sub>2</sub> )
0,7 U	Expand HF Enzyme Mix
ad 25 µl	H <sub>2</sub> O

Temperaturprogramm:	a) 2 min 94°C	Erstmaliges Denaturieren der DNA
	b) 15 sek 94°C	Denaturieren der DNA
	c) 30 sek 45-68°C	Anlagern der Oligonukleotide.
	d) 45-120 sek 72°C	Elongation
	e) 10-25 x	Wiederholung der Schritte b), c) und d)
	f) 7 min 72°C	abschließende Elongation

### 2.2.12 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die Sequenzierung wurde von der Zentralen Bioanalytik (ZBA) des Zentrums für molekulare Medizin der Universität zu Köln (ZMMK) durchgeführt. Dazu wurden 50 ng gereinigtes PCR-Produkt oder 200-400 ng gereinigte Plasmid-DNA eingesetzt, 0,5 µl Oligonukleotide (10 µM) hinzugefügt und das Volumen des Ansatzes mit H<sub>2</sub>O auf 6 µl eingestellt. Die Sequenzierung erfolgte nach Zugabe von 3,6 µl „Big Dye v1.1 Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystems) automatisiert mit einem Plattensequenzierer („Abi Prism 377 DNA Sequencer“, Applied Biosystems). Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit geeigneten Computerprogrammen (Chromas v1.45 oder GeneTool Lite v1.0, BioTools Inc.). Die ermittelten Sequenzen wurden entweder mit dem Programm GeneTool Lite oder internetbasiert mittels NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mit den Datenbanksequenzen verglichen.

### 2.2.13 Extraktion und Aufreinigung von mRNA aus Gehirngewebe

Die Extraktion und Aufreinigung von mRNA aus Gehirngewebe erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Herstellervorschrift. Dazu wurden zunächst Gehirne aus 2,5 Jahre alten Mäusen präpariert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Anschließend wurden 30 mg gefrorenes Gewebe in 600 µl Puffer RLT (Qiagen) mit einem Polytron Homogenisator (Kinematica AG) homogenisiert und die mRNA über Affinitätssäulen gereinigt. Die Elution erfolgte in 30 µl H<sub>2</sub>O.

### 2.2.14 Präzipitation von mRNA

Zu einer mRNA-Lösung wurde 0,1 Vol 2,5 M Kac (pH 5,0) und 2,5 Vol eiskaltes Ethanol (96%, v/v) gegeben und die mRNA 30 min bei -20°C präzipitiert. Anschließend wurde 5 min bei 4°C und 20000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen, die RNA in 70% (v/v) eiskaltem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet bei RT getrocknet und in H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 2.2.15 Reverse Transkription von mRNA und Amplifikation der Matrilin-4

#### Transkripte

Um die aus Gehirn isolierte mRNA in mit dem Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umzuschreiben wurden 0,5 µl RNA-Lösung mit 0,4 µl NRS-Oligo(dT) Oligonukleotid (69 µM) (s. Tab. 2.1) und 5 µl H<sub>2</sub>O versetzt und das Oligonukleotid 10 min bei 75°C hybridisiert. Dem Ansatz wurden

2 µl	5 x RT-Puffer (GibcoBRL)
1 µl	DTT [100 mM]
0,4 µl	dNTP Mix [25 mM]
0,2 µl	RNasin (Amersham Life Sciences)
100 U	SuperSript II Reverse Transkriptase (GibcoBRL)

hinzugefügt. Die Reverse Transkriptase Reaktion erfolgte 1 h bei 42°C.

Die Amplifikation von Matrilin-4 Transkripten erfolgte danach durch analytische PCR auf cDNA, die anhand der aus Gehirngewebe isolierten mRNA erstellt worden war. Dazu wurden die Oligonukleotide matm412 und matm45 (s. Tab.2.1) verwendet. Die PCR Produkte wurden anschließend auf einem Agarosegel aufgetrennt, aus der Agarose eluiert und mit den selben Oligonukleotiden sequenziert.

### 2.2.16 Klonierung von Volllänge Matrilinkonstrukten mit wildtypischem und mutiertem „EE“-Motiv

Volllänge Konstrukte von murinem Matrilin-1, -2 oder -3 mit wildtypischem oder mutierten „EE“-Motiv waren bereits vorab erstellt worden und lagen im Klonierungsvektor pBluescript II KS vor (Ehlen, Diplomarbeit, 2002). Sie besaßen durch PCR eingeführte SpeI-Restriktionsschnittstellen am 5'-Ende und NotI-Restriktionsschnittstellen am 3'-Ende. Um sie später als rekombinante Proteine in 293EBNA Zellen zu exprimieren, wurden sie nach Verdau mit SpeI und NotI in den mit NheI und NotI geschnittenen Expressionsvektor pCEP-Pu C-strep kloniert. Dazu wurden geschnittene Fragmente und Vektor auf Agarosegelen aufgetrennt, die entsprechenden Banden aus den Gelen ausgeschnitten und die DNA aus der Agarose eluiert. Anschließend erfolgte eine Ligation der Fragmente mit dem Vektor und eine Transformation in kompetente Bakterien. Bakterien-Einzelkolonien, die die korrekten Plasmide enthielten, wurden durch analytische PCR identifiziert. Anschließend wurden Flüssigkulturen von ihnen erstellt, aus denen die Plasmid-DNA isoliert wurde. Die Identität der Konstrukte wurde durch Restriktionsanalyse mit den Enzymen AflII und NotI überprüft.

### 2.2.17 Herstellung wildtypischer und chimärer Matrilin-4 Konstrukte ohne VWA1 Domäne

Die Generierung eines Konstrukts (4dA1), das der kürzeren Spleißvariante von murinem Matrilin-4 ohne VWA1 Domäne entsprach (Wagener *et al.*, 1998a), erfolgte zunächst durch präparative PCR auf einem Volllänge Konstrukt von Matrilin-4 (Klatt *et al.*, 2001) mit den Oligonukleotiden m4dA1fw und m4dA1rev. Das PCR-Produkt wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt und aus diesem eluiert. Anschließend wurde es über neu eingeführte SpeI und BamHI Restriktionsschnittstellen in den Vektor pBluescript II KS kloniert und mit den Oligonukleotiden T3, T7 und matm451 sequenziert.

Die Erstellung von Konstrukten mit wildtypischer („EE“) und mutierter („QQ“) Proteaseschnittstelle, bei denen die Matrilin-4 Scharnierregion gegen die Matrilin-1 Scharnierregion ausgetauscht wurde (4dA1EEDP bzw. 4dA1QQDP) erfolgte in zwei Schritten. Um die entsprechenden Mutationen und eine zusätzliche NdeI Schnittstelle über die Oligonukleotide einzuführen, wurde für beide Konstrukte jeweils ein längeres 5'-Fragment und ein kurzes 3'-Fragment amplifiziert. Die 5'-Fragmente enthielten die Sequenz vom 5'-Ende bis zur Mutagenesestelle (also der Scharnierregion des Proteins), die 3'-Fragmente entsprachen der Sequenz von dieser Stelle bis zum 3'-Ende der Matrilin-4 cDNA. Die 5'-Fragmente von 4dA1EEDP und 4dA1QQDP wurden mit den Oligonukleotiden 4dA1fw und m4dA1hrm1as bzw. m4dA1hrm1Qas (s. Tab. 2.1) amplifiziert, die 3'-Fragmente mit den Oligonukleotiden 4dA1hrm1s bzw. 4dA1hrm1Qs und 4dA1rev. Die PCR Produkte wurden auf Agarosegelen aufgetrennt und daraus eluiert. Anschließend wurden jeweils zusammen gehörende 5'- und 3'-Fragmente gemeinsam mit NdeI geschnitten, das Enzym 20 min bei 65°C hitzeinaktiviert, den Ansätzen ATP (Endkonzentration 10 mM) und T4 DNA-Ligase (10 U) zugefügt und die geschnittenen Fragmente 2 h bei RT ligiert. Danach wurden die ligierten DNA-Fragmente aus der Lösung aufgereinigt, mit BamHI und SpeI geschnitten und in den Vektor pBluescriptII KS kloniert. Die Identifikation von Bakterienklonen mit den erwünschten Konstrukten erfolgte durch analytische PCR auf den Einzelkolonien. Von potentiellen Kandidaten wurden Flüssigkulturen angeimpft, die Plasmide aus den Bakterien isoliert und nach Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung jeweils ein Klon zur weiteren Verwendung ausgewählt. Korrekte Plasmide von 4dA1, 4dA1EEDP und 4dA1QQDP wurden über die BamHI und SpeI Restriktionsschnittstellen in den Vektor pCEP-Pu V27 kloniert.

### 2.3 Zellkulturarbeiten

#### 2.3.1 Kultivierung und Expansion von 293EBNA Zellen

Zur rekombinanten Expression wurde die humane Nierenzelllinie HEK-293EBNA (Invitrogen) verwendet. Diese enthält eine Neomycin-Resistenz und ist dadurch mit Geneticin (G418) selektionierbar, außerdem enthält sie das EBNA-1 Gen (*Epstein-Barr virus nuclear antigen*), welches die Expression und Replikation des episomalen Vektors pCEP-Pu unterstützt.

293EBNA Zellen, die Matrilin-4 mit wildtypischem (Klatt *et al.*, 2001) oder mutiertem „EE“-Motiv (Ehlen, Diplomarbeit, 2002) rekombinant mit C-terminaler StrepII-Markierung exprimierten, waren bereits vorhanden. 293EBNA Zellen, die mit ADAMTS-2, ADAMTS-14 oder leerem Vektor stabil transfiziert worden waren (Colige *et al.*, 2002), wurden von A. Colige (Lüttich, Belgien) zur Verfügung gestellt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in DMEM/F12 (1:1) Nährmedium (GibcoBRL) mit 10% (v/v) FCS (fötales Kälberserum), 2 mM Glutamin (GibcoBRL) und 0,01 Vol Penicillin/Streptomycin (GibcoBRL). Bei Bedarf wurde dem Medium G418 (0,25 mg/ml), Puromycin (0,5 µg/ml) und/oder Hygromycin B (200 µg/ml) zugesetzt. Bei serumfreier Kultivierung wurde auf die Zugabe von FCS verzichtet.

Zur Expansion wurden konfluente Einzellschichten dreimal in PBS gewaschen und anschließend 5 min mit Trypsin/EDTA (0,25%/2 mM in PBS) bei 37°C von der Zellkulturschale abgelöst und die Zellen vereinzelt. Danach wurde der Zellsuspension 2-10 Vol Medium zugesetzt, um das Trypsin zu inaktivieren, und die Zellen im Verhältnis 1:2 bis 1:10 passagiert.

#### 2.3.2 Kryokonservierung von Zellen

Zellen, die zu ca. 80% konfluent gewachsen waren, wurden mit Trypsin von den Zellkulturschalen abgelöst und vereinzelt, mit mind. 2 Vol Medium versetzt und die Zellen 5 min bei 4000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen einer Zellkulturschale (Durchmesser: 10 cm) in 1 ml Einfriermedium (Medium mit 20% (v/v) FCS und 10% (v/v) DMSO) resuspendiert. Danach wurden sie in Einfrierröhrchen (Greiner) in einem Gefäß mit Isopropanol langsam (ca. -1°C/min) auf -80°C eingefroren. Die langfristige Lagerung (>6 Monate) erfolgte in flüssigem Stickstoff.

#### 2.3.3 Transfektion von 293EBNA Zellen

Zur Transfektion von 293EBNA Zellen mit Plasmid-DNA wurde das nicht-liposomale Reagens FuGENE 6 (Roche) verwendet. Dazu wurden Zellen genommen, die zu 50-70% konfluent gewachsen waren, und das Medium gewechselt. Parallel dazu wurden

3 µl FuGene6-Lösung/µg Plasmid-DNA in 100 µl serumfreiem Medium verdünnt und 5 min bei RT inkubiert. anschließend wurden 1-3 µg Plasmid-DNA hinzu gegeben und für weitere 15 min bei RT inkubiert. Das FuGENE-Medium-DNA Gemisch wurde zu dem Zellkulturmedium beigefügt und die Zellen 24 h inkubiert. Anschließend erfolgte eine 2-3 wöchige Selektionierung der Zellen mit geeigneten Antibiotika.

### **2.3.4 Ernte serumfreier, konditionierter Überstände**

Die Zellen konfluent bewachsener Zellkulturschalen wurden zweimal kurz mit PBS gewaschen und anschließend in serumfreiem Medium kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium erneut gewechselt und die Überstände verworfen. Die Ernte der konditionierten Überstände erfolgte 2-5 Tage nach Mediumwechsel. Die geernteten Überstände wurden zur Entfernung restlicher Zellen und Zellfragmente 20 min bei 8000-12000 x g und 16°C oder RT zentrifugiert. Bei Bedarf wurde den Überständen zur Konservierung  $\text{NaN}_3$  (Endkonzentration 0,02% (w/v)) zugefügt. Eine eventuelle kurzfristige Lagerung erfolgte bei 4°C oder RT.

### **2.3.5 Inkubation Matrilin-4 exprimierender Zellen mit Proteaseinhibitoren**

293EBNA Zellen, die rekombinant C-terminal StreptII-markiertes Matrilin-4 exprimierten, wurden auf 24-Loch Zellkulturschalen passagiert und in serumhaltigem Medium kultiviert, bis sie konfluente Einzellschichten bildeten. Anschließend wurden sie zweimal kurz in PBS gewaschen und für 24 h in serumfreiem Medium kultiviert, um restliche Serumproteine zu entfernen. Danach wurden sie in serumfreien Medien kultiviert, denen zuvor verschiedene Proteaseinhibitoren in jeweils drei unterschiedlichen Konzentrationen oder die entsprechenden Lösungsmittel (DMSO, Ethanol, Methanol oder  $\text{H}_2\text{O}$ ) zugefügt worden waren (s. Tabelle 2.4). Die Konzentrationen richteten sich nach den Herstellerempfehlungen, wurden aber auch in jeweils zehnfach geringerer oder höherer Konzentration eingesetzt. Die Konzentrationen der zur Negativkontrolle eingesetzten Lösungsmittel waren analog zur geringsten Verdünnung der entsprechenden Inhibitoren.

Nach 12 stündiger Inkubation wurden die Medien geerntet, unlösliche Bestandteile 5 min bei 12000 x g abzentrifugiert, die Überstände in neue Gefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Anschließend wurden die Zellen für weitere 16 h in neuen Medien mit frisch zugesetzten Inhibitoren kultiviert, die Überstände geerntet und der Vorgang für eine weitere Inkubationsdauer von 24 h wiederholt.

Die Inhibitoren von Metalloproteasen waren 1,10-ortho-Phenanthrolin (Beynon & Bond, 1989), Amastatin-HCl (Umezawa, 1985, Amoscato *et al.*, 1989, Menozzi *et al.*, 1991, Robertson *et al.*, 1992) und, als Inhibitor von MMPs, GM6001 (Galardy *et al.*, 1994a, Galardy *et al.*, 1994b, Solorzano *et al.* 1997). Serinproteasen wurden mit AEBSF (4-(2-Aminoethyl)benzolsulfonylfluoridhydrochlorid; Lawson *et al.*, 1982; Lunn & Sansone, 1994) und Aprotinin (Zyznar *et al.*, 1981, Hewlett *et al.*, 1990, Gray *et al.*, 1994) inhibiert. Als Inhibitor einiger Serin- und Cysteinproteasen wurde Leupeptin (Umezawa, 1976, Neeffjes & Ploegh, 1992, Benistant *et al.*, 1994, Carlin *et al.*, 1994) angewendet, mit E-64 (Barrett *et al.*, 1982, Montenez *et al.*, 1994) und dessen membranpermeabler Version E-64d (Tamai *et al.*, 1986, Tamai *et al.*, 1987, Buttle, *et al.*, 1992) wurde ein breiteres Spektrum von Cysteinproteasen inhibiert. Pepstatin A (Umezawa, 1976, Hansen *et al.*, 1988, Lammers & Jamieson, 1988, Tyagi, 1992) wurde zur Inhibition von Aspartatproteasen eingesetzt, und die Aktivität von Proproteinkonvertasen wie Furin mit dem spezifischen Inhibitor Decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-chloromethylketon (Garten *et al.*, 1994; Denault *et al.*, 1995; Mains *et al.*, 1997) inhibiert. Weiterhin wurde der TGF- $\beta$  Inhibitor SB431542 (Massague *et al.*, 2000, Laping *et al.*, 2002) verwendet.

**Tab. 2.4: Angewendete Inhibitoren**

Inhibitor	Lösungsmittel	Endkonzentrationen	Bezugsquelle
1,10-o-Phenanthrolin	Methanol	10; 100; 1000 $\mu$ M	Sigma
Amastatin	Ethanol	1; 10; 100 $\mu$ M	Serva
GM 6001	DMSO	0,1; 1; 10; 30 $\mu$ M	Calbiochem
AEBSF	Wasser	20; 200; 2000 $\mu$ M	Gerbu
Aprotinin	Wasser	0,1; 1; 10 $\mu$ g/ml	Sigma
Leupeptin	Wasser	1; 10; 100 $\mu$ M	Sigma
E-64	DMSO	0,1; 1; 10 $\mu$ M	Serva
E-64d	DMSO	0,1; 1; 10 $\mu$ M	Serva
Pepstatin A	Methanol	0,1; 1; 10 $\mu$ M	Serva
Furin Inhibitor	DMSO	1; 10; 100 $\mu$ M	Alexis
SB431542	DMSO	0,5; 5; 50 $\mu$ M	Sigma

### 2.3.6 Isolierung und Kultivierung primärer muriner Chondrozyten

Primäre murine Chondrozyten wurden aus Sternum und Rippen neugeborener und bis zu vier Tage alter Mäuse isoliert. Dazu wurden Rippen und Sternum aus vier bis sechs Tieren präpariert und Haut-, Muskel- und andere Gewebe entfernt. Anschließend wurde das präparierte Knorpelgewebe in PBS gewaschen und für 16 h im Brutschrank

in Collagenase P (1 mg/ml) verdaut. Danach wurde die Suspension 5 min bei 100 x g zentrifugiert, die sedimentierten Zellen in serumfreiem Medium aufgenommen und durch einen 100 µm und 40 µm Filter filtriert. Das Filtrat wurde zur Reinigung der Zellen erneut zweimal 5 min bei 100 x g zentrifugiert und die sedimentierten Zellen abschließend in serumfreiem Medium resuspendiert, die Zellzahl mittels Neubauer Kammer bestimmt und die Zellen in Zellkulturschalen ausplattiert. Kultivierung und Expansion erfolgte wie bei den 293EBNA Zellen, wobei das Nährmedium keine Selektionsantibiotika enthielt. Weiterhin wurde es mit 100 µM (Endkonzentration) Ascorbat supplementiert, welches täglich frisch zugesetzt wurde. Da die Zellen schnell dedifferenzieren wurden primäre Chondrozytenkulturen maximal 10-14 Tage kultiviert.

## 2.4 Proteinchemische Methoden

### 2.4.1 Affinitätsreinigung rekombinanter Proteine

Die Affinitätsreinigung rekombinant exprimierter Matrilin erfolgte über deren C-terminale StrepII-Markierung. Dazu wurden Proteine in konditionierten Überständen vor der Reinigung bei Bedarf mit Hilfe einer druckbetriebenen, gerührten Amicon Filtrationszelle (Millipore) unter Verwendung eines Zellulosefilters mit molekularer Ausschlussgrenze von 5000 Da (PLCC, Millipore) zehnfach aufkonzentriert.

Zur Aufreinigung der Proteine wurde eine Streptactin-Sepharose (IBA) verwendet. 1-2 ml dieser Matrix wurden zunächst in eine Plastiksäule überführt und mit einer Durchflussrate von 0,2 ml/min mit 10-20 Säulenvolumen (SV) Puffer W (s. u.) gepackt und äquilibriert. Anschließend wurden 500 ml (oder 50-100 ml zehnfach konzentrierte) konditionierte Überstände mit einer Durchflussrate von 0,05-0,1 ml/min bei RT über die Säule gegeben, damit StrepII-markierte Proteine an die Säule binden konnten. Das Waschen der Säule erfolgte mit 5-10 SV Puffer W. Gebundene Proteine wurden mit 10 SV Puffer E eluiert und in Fraktionen von 0,5-1 ml Volumen gesammelt.

Puffer W:           150 mM NaCl  
                  100mM Tris-HCl, pH 8,0

Puffer E:           150 mM NaCl  
                  2,5 mM Desthiobiotin  
                  100mM Tris-HCl pH 8,0

Zur Aufreinigung von intrazellulärem Matrilin-4 wurden zehn konfluent mit Matrilin-4 exprimierenden 293EBNA Zellen bewachsene Zellkulturschalen dreimal 5 min in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 15 min mit Trypsin von den Schalen abgelöst, vereinzelt und extrazelluläre Proteine degradiert. Die Zellsuspension wurde

mit 10 Vol eiskaltem PBS verdünnt und die Zellen 5 min auf Eis gewaschen. Danach wurden die Zellen 5 min bei 1000 x g und 4°C sedimentiert, in 10 ml eiskaltem PBS resuspendiert und erneut 5 min auf Eis gewaschen und durch Zentrifugation sedimentiert. Dieser Vorgang wurde 4 x wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 5 ml Lysispuffer (s. u.) resuspendiert und 10 min auf Eis lysiert.

Lysispuffer:        150 mM NaCl  
                      1% (v/v) Nonidet P-40  
                      2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)  
                      2 mM NEM  
                      100 mM Tris-HCl pH 8,0  
                      1 Tablette / 50 ml Complete Protease inhibitor Cocktail (Roche)

Danach wurden unlösliche Bestandteile 15 min bei 4°C und 12000 x g abzentrifugiert, der Überstand mit 10 Vol Puffer W verdünnt und Matrilin-4 wie oben beschrieben über eine Streptactin-Säule affinitätsgereinigt.

### 2.4.2 Sequentielle Extraktion von Proteinen

Zur Herstellung von Extrakten aus verschiedenen Geweben wurden die entsprechenden Organe oder Gewebe präpariert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei Bedarf bei -80°C gelagert. Anschließend wurden die Gewebe entweder mit einem Mörser unter flüssigem Stickstoff oder mit einem Dounce-Homogenisator in TBS-Extraktionspuffer (s. u.) homogenisiert. Der erste Extraktionsschritt erfolgte 16h in TBS-Extraktionspuffer bei 4°C. Anschließend wurden unlösliche Bestandteile 15 min bei 8000-12000 x g abzentrifugiert, der TBS-Extrakt abgenommen und bei -20°C gelagert. Das Pellet wurde in EDTA-Extraktionspuffer (s. u.) resuspendiert und EDTA-lösliche Proteine 16h bei 4°C extrahiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der EDTA-Extrakt ebenfalls bei -20°C gelagert, das Pellet in GuHCl-Extraktionspuffer (s. u.) resuspendiert und Proteine 16h bei 4°C extrahiert. Zur nachfolgenden SDS-PAGE Analyse wurden die Proteine in den Extrakten mit Ethanol oder Aceton präzipitiert.

TBS-Extraktionspuffer:	150 mM NaCl	EDTA-Extraktionspuffer:	500 mM NaCl
	50 mM Tris-HCl pH 7,4		10 mM EDTA
	2 mM PMSF		50 mM Tris-HCl pH7,4
	2 mM NEM		2 mM PMSF
	1 Tabl./50 ml Complete protease inhibitor cocktail (Roche)		2 mM NEM

GuHCl-Extraktionspuffer: 4 M Guanidinium-HCl  
50 mM Tris-HCl pH 7,4

### 2.4.3 Herstellung und Affinitätsreinigung von Antikörpern

Zur Herstellung Schnittstellen-spezifischer Neo-Epitop Antikörper wurden je zwei Kaninchen und zwei Meerschweinchen mit Peptiden der Sequenz H<sub>2</sub>N-GIGAGTELRSPC-CONH<sub>2</sub> (Matn4pC) und Ac-NLKGSICPEE-COOH (Matn4pN) immunisiert. Die Peptidsynthese, Immunisierung und Gewinnung der Antiseren erfolgte durch Pineda Antikörper Service (Berlin).

Die Affinitätsreinigung ausgewählter Antiseren erfolgte auf CNBr-Sepharose. Dazu wurden zunächst je 0,5 mg lyophilisiertes Peptid in 2,5 ml Kopplungspuffer (s. u.) gelöst. Zur Kopplung der Peptide wurden je 150 mg CNBr-Sepharose (Amersham Pharmacia) in 500 µl 1 mM HCl für 1h bei 4°C aktiviert, 5 min bei 1000 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Sepharose erneut in 500 µl 1 mM HCl resuspendiert. Anschließend wurde die aktivierte CNBr-Sepharose (in je 500 µl 1 mM HCl) mit den jeweils 2,5 ml gelösten Peptiden (in Kopplungspuffer) gemischt und die Peptide 16 h bei 4°C an die Sepharose gekoppelt. Danach wurde die Sepharose 5 min bei 1000 x g und 4°C sedimentiert und in 1 ml Kopplungspuffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (wie oben) wurde die Sepharose in 750 µl 0,1 M Tris (pH 8,0) aufgenommen und freie Bindungsstellen durch 2h Inkubation bei 4°C abgesättigt. Zum Schluss wurde die Peptid gekoppelte Sepharose in eine kleine Säule gepackt.

Kopplungspuffer: 0,5 M NaCl  
100 mM NaHCO<sub>3</sub>

Zur Reinigung der Antikörper wurden die Affinitätssäulen nach Kopplung der Peptide mit 3 SV 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 gewaschen. Anschließend wurden sie dreimal mit je 10 SV 0,5 M NaCl; 0,1 M Natriumacetat pH 4,0 und je 10 SV 0,5 M NaCl; 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 abwechselnd gewaschen. Je 5 ml Antiserum wurden durch Zentrifugation (1h, 12000 x g, 4°C) geklärt und danach in jeweils 10 Vol 10 mM Tris pH 7,5 verdünnt. danach wurden die Antiseren 3 Tage über die Säulen rezirkuliert (Durchflussrate 0,1 ml/min), um die Antikörper an die Säulen zu binden. Das Waschen der Säule erfolgte erst mit 5 SV 10 mM Tris-HCl pH 7,5 und danach mit 5 SV 0,5 M NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 7,5. Gereinigte Antikörper wurden in 6 Fraktionen von je 0,75 ml mit 100 mM Glycin pH 2,5 eluiert, wobei in die Elutionsgefäße je 0,75 ml 1 M Tris-HCl pH 8,8 vorgelegt worden waren.



### 2.4.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE (Laemmli, 1970) erfolgte nach dem Verfahren der diskontinuierlichen vertikalen Elektrophorese mit dem Hoefer SE 200 Mighty Small System (Amersham Pharmacia).

Bei den Trenngelen wurde die Acrylamidkonzentration mit einer 30% (w/v) Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (37,5:1; National Diagnostics) individuell eingestellt. Bei Bedarf wurde ein linearer Gradient aus zwei Lösungen mit unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen gegossen. In Sammelgelpuffern betrug die Konzentration von Acrylamid immer 4%.

Sammelgelpuffer:	375 mM Tris-HCl pH 6,8	Trenngelpuffer	125 mM Tris-HCl, pH 8,8,
	0,1% (w/v) SDS		0,1% (w/v) SDS

Nachdem die Acrylamidkonzentration in den Gelpuffern eingestellt worden war, wurde die radikalische Polymerisation durch Zugabe von 100 µl Ammoniumpersulfatlösung (10%, v/v) und 4 µl TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin) pro 7 ml Gelpuffer ausgelöst, die Lösung oder ein Gradient aus zwei Lösungen unterschiedlicher Acrylamidkonzentrationen in die Gießkammer gegossen und mit wassergesättigtem Butanol überschichtet. Nach abgeschlossener Polymerisation wurde das Butanol entfernt, der Sammelgelpuffer mit Ammoniumpersulfatlösung und TEMED versetzt, auf das Trenngel gegossen und auspolymerisiert.

Zur Probenvorbereitung wurden Proteinlösungen mit SDS-PAGE Auftragspuffer versetzt und 10 min bei RT oder 40°C inkubiert. Bei Bedarf wurde dem Auftragspuffer zuvor β-Mercaptoethanol (Endkonz. 0,5%; v/v) oder Dithiothreitol (DTT; Endkonz. 10mM) zugefügt und die Proteine 5-10 min bei 100°C reduziert.

Die auspolymerisierten SDS-Polyacrylamidgele wurden mit SDS-PAGE Elektrophoresepuffer überschichtet und die vorbereiteten Proben auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer angelegten Spannung von 150 V.

### 2.4.8 Coomassie Färbung von Proteinen

Zur Färbung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel wurden die Gele 30 min in Coomassie Färbelösung (s. u.) gefärbt und anschließend in Entfärbelösung (s. u.) wieder entfärbt, bis nur noch die Proteinbanden sichtbar waren. Die Gele konnten in 7% (v/v) Essigsäure bei RT aufbewahrt werden.

Coomassie Färbelösung	0,2% (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R250
	50% (v/v)	Methanol
	10% (v/v)	Essigsäure
Entfärbelösung	40% (v/v)	Methanol
	10% (v/v)	Essigsäure

### 2.4.9 Western Blot (Immunoblot)

Unter einem Western Blot oder Immunoblot versteht man die spezifische Detektion von Proteinen mit Antikörpern, nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine in einer SDS-PAGE. Dazu wurden die Proteine nach einer SDS-PAGE im Tankblot (Hoefer TE 22 Mighty Small Transphor Tank Transfer Unit) bei 400 mA für 1-2 h aus dem Gel auf eine Nitrozellulose- (Protran BA45, Schleicher & Schüll) oder Polyvinylidenfluorid- (PVDF) Membran (Immobilon P<sub>80</sub>, Millipore) transferiert. Der Blotpuffer bestand aus 50 mM Borsäure pH 8,5 und 10% (v/v) Methanol. Zum besseren Transfer kleiner (<20 kDa) Proteine wurden 20 % (v/v) Methanol eingesetzt.

Anschließend wurde die Membran reversibel mit Ponceau S-Lösung (Serva) gefärbt und zunächst mit Wasser entfärbt, bis nur noch die Proteine sichtbar waren. Die vollständige Entfärbung erfolgte mit TBS. Danach wurden freie Bindungsstellen der Membran und unspezifische Proteinbindungsstellen durch 1 stündige Inkubation der Membran mit 5% (w/v) Magermilchpulver oder 2% (w/v) BSA (bovines Serumalbumin) in TBS blockiert. Die spezifische Detektion der nachzuweisenden Proteine erfolgte durch 1 stündige Inkubation mit Antikörpern gegen das jeweilige Protein (s. Tab. 2.2). Die Antikörper wurden entweder in 5% (w/v) Magermilchpulver/TBS oder in TBST verdünnt. Bei Inkubation mit anti-Matn4pC Antikörpern wurde ein Aliquot der verdünnten Antikörper als Negativkontrolle mit 0,2 µg/ml des Peptids Matn4pC versetzt und 16 h bei 4°C vorinkubiert. Nach Inkubation mit den Primärantikörpern wurde die Membran dreimal 5 min in TBST und dreimal 5 min in TBS gewaschen. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte durch einstündige Inkubation der Membran mit Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierten Sekundärantikörpern (s. Tab. 2.3). Nach erneutem Waschen der Membran (3 x TBS, 3 x TBST, je 5 min) wurde die Chemolumineszenzreaktion durch 1 min Inkubation mit folgendermaßen angesetzter Lösung ausgelöst:

333 µl Tris-HCl (pH 8,5) [3 M]  
22 µl p-Coumarinsäure [90 mM]  
50 µl Luminol [250mM]  
3 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [30% (v/v)]  
ad 10ml H<sub>2</sub>O

Die Chemolumineszenzsignale wurden mit einem „Super RX“ – Röntgenfilm (Fuji) detektiert.

### **2.4.10 MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption and ionisation – time of flight*) Analysen**

Zur massenspektrometrischen Analyse im MALDI-TOF wurden Proteine zunächst reduziert und alkyliert. Dazu wurde einer Proteinlösung mit DTT (Endkonzentration 5 mM) versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden reduzierte Sulfhydrylgruppen nach Zugabe von Iodacetamid (Endkonzentration 20 mM) 1 h bei RT im Dunkeln wieder alkyliert. Entsalzen und Aufkonzentrieren der Proteine erfolgte auf C<sub>18</sub> Zip-Tips (Millipore). Dabei wurden sie in 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) gewaschen und in 50% (v/v) Acetonitril; 0,1% (v/v) TFA eluiert. Die MALDI-TOF Analyse erfolgte auf einer Dihydroxybenzoesäurematrix (20-40 ng/ml in Acetonitril/0,1% TFA; 1:2) in einem Reflex 4 Massenspektrometer (Bruker). Die Messung erfolgte im Positivionenmodus mit Reflektor bei einer Beschleunigungsspannung von 20 kV. Die Messung wurde von der Zentralen Bioanalytik (ZBA) des ZMMK durchgeführt.

### **2.4.11 N-terminale Sequenzierung von Proteinen nach Edman**

N-terminale Aminosäuresequenzen der Prozessierungsprodukte rekombinanter Matrilin-3 Proteine wurden durch Sequenzierung nach Edman bestimmt. Dazu wurde eine Proteinlösung mit 1/4 Vol 4 x SDS-PAGE Auftragspuffer (pH 8,0 anstelle pH 6,8) und DTT (Endkonzentration 5 mM) versetzt und 20 min bei 80°C inkubiert. Nach Abkühlen wurde 1/3 Vol 6 M Acrylamid hinzugefügt und reduzierte Sulfhydrylgruppen 2h bei RT (in Dunkelheit) alkyliert. Anschließend wurden die Proteine auf einem 8-20% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Tankblotverfahren 3 h bei 200 mA auf eine PVDF-Membran transferiert. Danach erfolgte eine 30 minütige Färbung der Membran mit 0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 in 50% (v/v) Methanol. Die Membran wurde im Anschluss zunächst mit Methanol, danach mit 50% (v/v) Methanol entfärbt. Die Proteinbanden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten, die Membranschnipsel in Methanol gewaschen und die Proteinsequenzen in zehn Zyklen in einem Procise Protein Sequencer (Applied Biosystems) bestimmt. Messung und Auswertung erfolgten in der ZBA des ZMMK.

### 2.4.12 Inkubation von Matrilin-4 mit Proteasen

Die Inkubation von Matrilin-4 mit ADAMTS-4 erfolgte durch 3 h Inkubation des folgenden Ansatzes bei 37°C. Das Experiment wurde von H. Will (Invitex, Berlin) durchgeführt.

34,9 µl Puffer MT-0  
5 µl Inhibitor Mix  
3 µl ADAMTS-4 (0,1 mg/ml in MT-0)  
7 µl Matrilin-4 (0,99 mg/ml in 100 mM Tris pH 8,0)

Puffer MT-0:	150 mM NaCl	Inhibitor Mix:	4 mM	Pefabloc (Serva)
	5mM CaCl <sub>2</sub>		10 mM	Pepstatin A
	50 mM Tris-HCl pH 7,4		10 mM	Leupeptin
			10 mM	MES pH 6,0

Die Inkubation von Matrilin-4 mit Kallikrein-14 (hK14) erfolgte durch 1 oder 2 stündige Inkubation von Matrilin-4 (in 150 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl pH 8,0) mit 1 oder 10 nM hK14 in 500 mM Tris pH 7,5. Das Experiment wurde von L. Felber (Epalinges, Schweiz) durchgeführt.

Die Analyse der Inkubationen erfolgte durch SDS-PAGE Analysen mit nachfolgender Coomassie Färbung der Proteine im Gel.

### 2.4.13 *Pulse-chase* Experiment zur Analyse der Sekretionskinetik prozessierter Matrilin-4 Fragmente

Die radioaktive Markierung erfolgte durch Inkubation der Zellen in Anwesenheit von <sup>35</sup>S-markiertem L-Cystein und L-Methionin. Dazu wurden mit Matrilin-4 rekombinant exprimierenden 293EBNA Zellen konfluent bewachsene 6-Loch Schalen zunächst für 2h in serumfreien „DMEM without L-Glutamine, L-Methionine, L-Cysteine and sodium pyruvate“ (GibcoBRL) inkubiert. Die radioaktive Markierung der Proteine erfolgte dann durch 90 min Inkubation der Zellen in diesem Medium durch Zugabe von 50µCi/ml Medium Aktivität (NEG-722 Easytag Express Protein Labeling Mix, Perkin Elmer). Anschließend wurden die Zellen zweimal 5 min in PBS gewaschen und in serumfreiem Medium kultiviert. Die Ernte der Überstände erfolgte nach 30, 60 und 90 min sowie 2, 6 und 24h. Parallel dazu wurden die Zellrasen nach Ernte der Überstände geerntet und 5 min in 1 ml 1% (v/v) Nonidet-P40 (in 50mM Tris-HCl, pH 7,4) auf Eis lysiert.

Die Affinitätsreinigung der radioaktiv markierten Matrilin-4 Fragmente erfolgte im *batch*-Verfahren. Dazu wurden 20 µl äquilibrierte Streptactin-Sepharose/ml

Zellkulturüberstand oder Zelllysat hinzugefügt und 3 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde die Sepharose 5 min bei 1000 x g und RT sedimentiert und in 1 ml Puffer W (s. 2.4.1) gewaschen. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Die Elution erfolgte in 30 µl Puffer E (s. 2.4.1).

Im Anschluss daran wurde radioaktiv markiertes, aus Zellkulturüberständen und -lysaten affinitätsgereinigtes Matrilin-4 auf einem 4-12% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und das Gel zur Kontrolle mit Coomassie gefärbt. Danach wurde das Gel 1h in H<sub>2</sub>O gewässert und 1h in 1 M Natriumsalicylat gebadet. Nun konnte das Gel 3h bei 60°C in einem Vakuumtrockner (Drygel Sr. Slab Gel Dryer SE1160, Hoefer) getrocknet werden. Die Radioaktivität wurde durch Exposition des Gels (7 Tage) auf einer Storage Phosphor Screen – Platte (Molecular Dynamics) detektiert, mit einem Phosphor Imager (Molecular Dynamics) digital aufgezeichnet und der entsprechenden Software analysiert (Image Quant 5.1, Molecular Dynamics). Dieses Experiment wurde bereits vor dieser Arbeit durchgeführt, ausgewertet und beschrieben (Ehlen, Diplomarbeit, 2002).

#### **2.4.14 Subzelluläre Fraktionierung von 293EBNA Zellen durch isopyknische Dichtegradientenzentrifugation**

Zwei Zellkulturschalen (Durchmesser 10 cm), die konfluent mit Matrilin-4 exprimierenden 293EBNA Zellen bewachsen waren, wurden zweimal 5 min in PBS gewaschen und anschließend für 24h in serumfreiem Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen dreimal in serumfreiem Medium gewaschen (je 5 min), von den Zellkulturschalen abgeschabt, vorsichtig in 10 ml serumfreiem Medium aufgenommen und 5 min bei 1000 x g und RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde wieder vorsichtig in 10 ml serumfreiem Medium aufgenommen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Homogenisierungspuffer aufgenommen.

Homogenisierungspuffer: 0,25 M Saccharose  
10 mM Triethanolamin/Acetat pH 7,4  
2 mM PMSF  
2 mM NEM  
1 Tabl./50ml Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche)

Die Homogenisierung erfolgte in einem Dounce-Homogenisator mit Teflonstempel durch 15 Stöße. Anschließend wurden größere Zellfragmente wie Plasmamembran und Zellkerne durch 10 min Zentrifugieren bei 1000 x g und 4 °C entfernt. Danach wurde der Überstand abgenommen, vorsichtig geschüttelt und erneut zentrifugiert

(10 min, 1000 x g, 4°C). Währenddessen wurde ein 10-40% Saccharosegradient (in 50 mM Tris-HCl pH 7,4) in ein Zentrifugationsröhrchen gegossen. Anschließend wurde der Gradient mit dem Überstand des zentrifugierten Zellhomogenisates überschichtet und die Zellfragmente durch isopyknische Zentrifugation (20h, 38000 U/min, 4°C, Rotor: SW41TI, Zentrifuge: L7-55, Beckmann) in dem Saccharosegradienten aufgetrennt.

Zur Fraktionierung des Gradienten wurde das Zentrifugenröhrchen langsam in flüssigen Stickstoff getaucht, bis es vollständig gefroren war, und bei Bedarf bei -80°C gelagert. Anschließend wurden die Röhrchen mit dem Gradienten 5 min bei RT angetaut, die Kunststoffhülle des Zentrifugenröhrchens aufgesägt und der gefrorene Saccharosegradient mit einem Skalpell in 16 Scheiben geschnitten, die aufgetaut Fraktionen von jeweils ca. 0,5 ml ergaben. Zur Analyse und Dokumentation der Fraktionierung wurden die Proteine aus den Fraktionen mit Ethanol präzipitiert, auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und im Immunoblot mit Antikörpern gegen Markerproteine der einzelnen Kompartimente oder Matrilin-4 detektiert.

## 2.5 Immunhistologische Methoden

### 2.5.1 Erstellung von Gefrierschnitten

Zur Erstellung von Gefrierschnitten wurden Mausembryonen, neugeborene Mäuse oder präparierte Gewebe mit TissueTek (Sakura) Einfriermedium überschichtet und unter einem Binokular ausgerichtet. Während dessen wurde ein Becherglas mit 100-300 ml Isopentan in einem Gefäß mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Anschließend wurden die eingebetteten Gewebe in dem kalten Isopentan eingefroren und bei -80°C gelagert. Danach wurden mit einem Kryotom (CM3050, Leica) 5-7 µm dicke Gefrierschnitte hergestellt.

### 2.5.2 Immunfluoreszenznachweis von Proteinen

Zum Immunfluoreszenznachweis von Proteinen auf Zellen wurden diese auf LabTek Chamber Slides (Nunc) kultiviert, bis sie eine Konfluenz von ca. 50-60% erreicht hatten. Anschließend wurden sie zweimal 5 min in PBS gewaschen und für 24 h in serumfreiem Medium kultiviert. Nach erneutem zweimaligem Waschen (5 min, PBS) waren die Zellen für die Fixierung und Antikörperdetektion vorbereitet.

Gefrierschnitte wurden 1-16 h aufgetaut und getrocknet. Danach wurden sie dreimal 5 min in PBS rehydriert und gewaschen, um das Einfriermedium zu entfernen.

Die Fixierung der Zellen und Gewebe erfolgte 5 min bei -20°C in 95% (v/v) Ethanol (96% v/v) / 5% (v/v) Essigsäure. Danach wurden die Objektträger mit Zellen oder Gewebeschnitten zweimal 5 min in TBS und einmal 5 min in TBSTX gewaschen. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen durch 1h Inkubation in 2% (v/v) FCS in TBSTX abgesättigt. Die Detektion der nachzuweisenden Proteine erfolgte anschließend durch 3h Inkubation der Antikörper (s. Tab. 2.2), wobei diese in 2% (v/v) FCS in TBSTX verdünnt wurden. Bei Inkubation mit anti-Matn4pC Antikörpern wurde ein Aliquot der verdünnten Antikörper als Negativkontrolle mit 1 µg/ml des Peptids Matn4pC versetzt und 16 h bei 4°C vorinkubiert. Danach wurden die Objektträger dreimal je 5 min in TBSTX und einmal kurz in TBS gewaschen, bevor die Immunfluoreszenzdetektion mit Alexa<sup>488</sup>-konjugierten Sekundärantikörpern (s. Tab. 2.3) erfolgte. Dazu wurden die Antikörper ebenfalls in 2% (v/v) FCS in TBSTX verdünnt. Die Inkubation wurde 1h in Dunkelheit durchgeführt. Zum Schluss wurden die Schnitte oder Zellen erneut dreimal in TBSTX (je 5 min), einmal kurz in TBS und einmal kurz in H<sub>2</sub>O gewaschen, bevor die Objektträger mit Fluorescent Mounting Medium (Dako) eingedeckelt wurden. Die mikroskopische Betrachtung, Dokumentation und nachfolgende Bildprozessierung erfolgte mit einem Axiophot Mikroskop (Zeiss) und der Software Metamorph5.0 (Universal Imaging) und Photoshop CS (Adobe). Die Bildprozessierung von Aufnahmen, die direkt zu vergleichen waren, wurde stets mit identischen Parametern (z. B. für Kontrast etc.) durchgeführt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Charakterisierung des heterogenen Erscheinungsbildes der Matriline

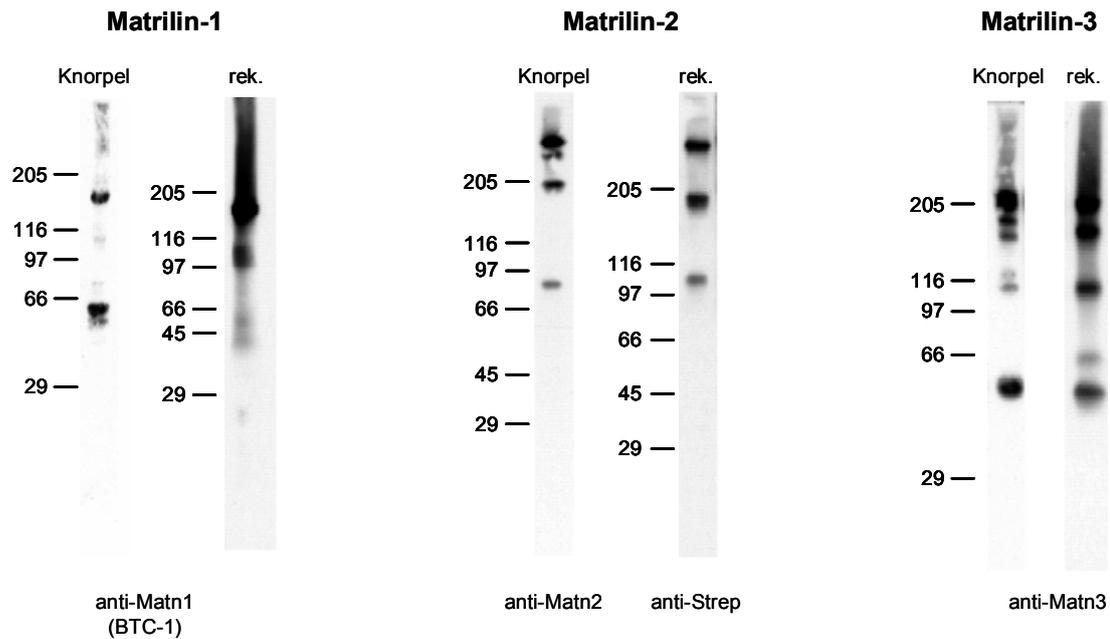
Aus früheren Arbeiten (Piecha *et al.*, 1999; Klatt *et al.*, 2000; Klatt *et al.*, 2001; Klatt, Dissertation, 2001) war bekannt, dass insbesondere Matrilin-2, Matrilin-3 und Matrilin-4, eine ausgeprägte Heterogenität bezüglich ihrer Fragmentierungsmuster nach SDS-PAGE aufweisen. Bei Matrilin-1 ist diese Heterogenität zwar auch vorhanden, jedoch wesentlich schwächer ausgeprägt. Gleichzeitig wurden in elektronenmikroskopischen Aufnahmen der rekombinanten Matrilin-2, -3 und -4 alle möglichen Oligomerisierungsgrade von Mono- bis Trimer (Matrilin-4) bzw. bis Tetramer (Matrilin-2 und -3) identifiziert, was zunächst auf eine unvollständige Assemblierung der Oligomerisierungsdomänen hindeutete. Für rekombinantes Matrilin-3 und -4 konnte jedoch gezeigt werden, dass dies Folge einer proteolytischen Prozessierung in der C-terminalen Scharnierregion zwischen der VWA2- und der für die Oligomerisierung verantwortlichen *coiled-coil* Domäne ist (Klatt *et al.*, 2001; Klatt, Dissertation 2001). Diese Scharnierregion besteht aus einer kurzen Sequenz von zwei bis elf Aminosäureresten, die möglicherweise keine Sekundärstruktur besitzt und somit für die Flexibilität der einzelnen Monomere in den Bouquet ähnlichen Oligomeren verantwortlich sein könnte.

Zur weiteren Charakterisierung einer potentiellen proteolytischen Prozessierung in der Scharnierregion sollten alle Matriline als C-terminal StrepII-markierte Fusionsproteine rekombinant exprimiert werden und das Bandenmuster in SDS-PAGE mit dem von Matrilinen verglichen werden, welche aus murinem Knorpelgewebe extrahiert wurden.

#### 3.1.1 Vergleich rekombinant exprimierter Matrilin mit Matrilinen aus murinen Gewebeextrakten

Analog zu Matrilin-4 (Klatt *et al.*, 2001) wurden 293EBNA Zellen mit gereinigter Plasmid-DNA von Volllängekonstrukten der Matrilin-1, -2 und -3 transfiziert. Die Konstrukte enthielten die Sequenz des BM40-Signalpeptids im 5'- und die Sequenz für die StrepII-Markierung im 3'-Bereich der Klonierungsstelle des Vektors pCEP-Pu (Kohfeldt *et al.*, 1997), so dass nach Transfektion rekombinante, C-terminal StrepII-markierte Fusionsproteine exprimiert und in den Zellkulturüberstand sezerniert wurden. Die Generierung der Konstrukte erfolgte vor Beginn dieser Arbeit (Ehlen, Diplomarbeit, 2002).

Nach Selektion der transfizierten Zelllinien mit Puromycin wurden die Zellen serumfrei kultiviert und die Expression der rekombinanten Matrilin-1, -2 und -3 durch eine SDS-PAGE der konditionierten Überstände mit anschließender Immundetektion im *western blot* nachgewiesen (s. Abb. 3.1). Weiterhin wurden sequentiell Proteinextrakte aus murinem Gelenkknorpel erstellt und die Fragmentierungsmuster der Matrilin mit denen der rekombinanten Proteine im Immunoblot verglichen.



**Abb. 3.1: Vergleich der rekombinant exprimierten Matrilin-1, -2 und -3 mit Matrilinen in murinen Gelenkknorpelextrakten.** Proteine aus konditionierten Überständen von 293EBNA Zellen, die rekombinant C-terminal StrepII-markiertes Matrilin-1, -2 oder -3 exprimieren (rek.), und eines EDTA-Extrakts aus murinem Gelenkknorpel (Knorpel) wurden auf 4-15% (Matrilin-1 und -3) oder 4-12%igen (Matrilin-2) Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und die Matrilin mit spezifischen Antikörpern gegen Matrilin-1, -2, -3 oder die Strep-Markierung detektiert. Angaben des Molekulargewichtsstandards in kDa.

Die Bandenmuster aller rekombinant exprimierten und nativ extrahierten Matrilin wiesen erwartungsgemäß eine starke Heterogenität auf, wobei die Muster der rekombinanten Proteine sich von denen der entsprechenden extrahierten Matrilin hinsichtlich Intensität und Heterogenität unterschieden.

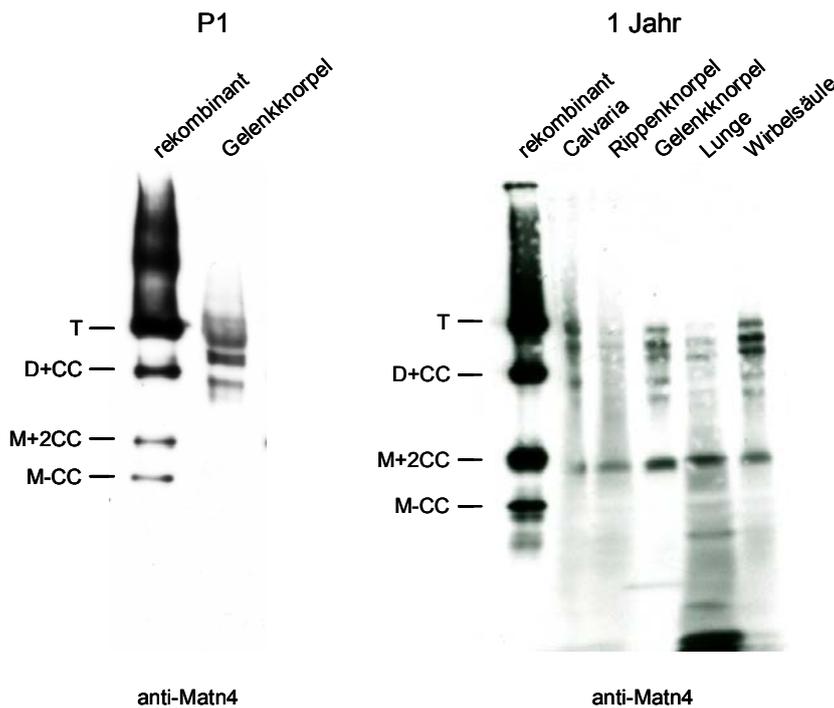
Matrilin-1 kam im Knorpel und als rekombinantes Protein hauptsächlich als Trimer mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 160 kDa (theoretisch: 156 kDa) vor. Ein potentiell prozessiertes Dimer mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 110 kDa (theor. 108 kDa), ein potentiell prozessiertes Monomerfragment bei ca. 70 kDa (theor. 61 kDa) und das abgeschnittene Monomer bei ca. 45 kDa (theor. 47 kDa) waren

ebenfalls zu erkennen. Aus murinem Knorpel extrahiertes Matrilin-1 wies zwei weitere, Banden bei ca. 60 bzw. 200 kDa auf, während rekombinantes Matrilin-1 zusätzlich eine immunreaktive Bande bei ca. 100 kDa zeigte (vgl. Abb. 3.4a).

Matrilin-2 konnte in Knorpelextrakten in vier Proteinbanden detektiert werden. Zwei Banden mit apparenten Molekulargewichten von weit über 200 kDa repräsentierten Tetramer (theor. 416 kDa) und Trimer (theor. 312 kDa). Die Banden bei ca. 205 und 90 kDa entsprachen annäherungsweise dem potentiell prozessierten Dimer (theor. 219 kDa) bzw. abgeschnittenen Monomer (theor. 98 kDa). Die Detektion von rekombinantem Matrilin-2 mit einem Antikörper gegen die C-terminale StrepII-Markierung zeigte drei immunreaktive Proteinbanden mit apparenten Molekulargewichten von ca. 110, 200 bzw. 300-400 kDa, die potentiell prozessiertes Mono-, Di- und Trimer oder Tetramer repräsentierten.

Auch bei Matrilin-3 waren in murinem Gelenkknorpelextrakt und im Überstand transfizierter 293EBNA Zellen alle oligomeren Formen von Mono- bis Tetramer vorhanden, wobei der Knorpelextrakt noch zwei weitere Fragmente mit apparenten Molekulargewichten von ca. 120 bzw. 170 kDa enthielt, während das prozessierte Monomer mit tetramerer *coiled-coil* Domäne fehlte.

Die heterogenen Bandenmuster von Matrilin-4 wurden bereits für Calvaria- und Gehirnextrakte neugeborener Mäuse beschrieben (Klatt *et al.*, 2001). Dabei entsprachen anti-Matrilin-4 immunreaktive Banden in einer SDS-PAGE-Analyse dem Trimer und prozessierten di- und monomeren Formen von rekombinantem Matrilin-4. Ein identisches Bandenmuster war in TBS-Extrakten von Calvaria, Rippenknorpel, Gelenkknorpel, Lunge und Wirbelsäule von ein Jahr alten Mäusen zu finden (s. Abb. 3.2, rechtes Panel). Auch in diesen Extrakten konnte Matrilin-4 in Banden, die Trimere (T; zur Nomenklatur s. Fußnote 1, S. 7) und prozessierte Di- (D+CC) und Monomere (M+2CC) repräsentieren, sowie in zwei weiteren Banden unterhalb des Trimers und einer unterhalb des prozessierten Dimers, identifiziert werden. In Lunge und Rippenknorpel waren die Matrilin-4 Signale allerdings sehr schwach. Trotz Überexposition des Röntgenfilms konnte in keinem der Extrakten eine Bande detektiert werden, die dem prozessierten Monomer ohne *coiled-coil* Domäne (M-CC) entspricht.



**Abb. 3.2: Heterogenität von Matrilin-4 in verschiedenen Gewebeextrakten.** Die Proteine eines EDTA-Extraktes aus Gelenkknorpel einer neugeborenen Maus (P1, linkes Panel) und von TBS-Extrakten aus Calvaria, Rippenknorpel, Gelenkknorpel, Lunge und Wirbelsäule einer ein Jahr alten Maus (rechtes Panel) wurden auf 4-12% SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und im *western blot* mit affinitätsgereinigten anti-Matn4 Antikörpern detektiert. Als Positivkontrolle wurde konditionierter Überstand mit rekombinantem Matrilin-4 aufgetragen (rekombinant).

Im Gelenkknorpel einer neugeborenen Maus war die Heterogenität der Matrilin-4-Fragmente deutlich geringer als bei der ein Jahr alten Maus (s. Abb. 3.2, linkes Panel). Das prozessierte Monomer mit vollständiger *coiled-coil* Domäne (M+2CC) konnte nicht nachgewiesen werden, außerdem waren neben dem Trimer (T) nur zwei weitere Fragmente detektierbar.

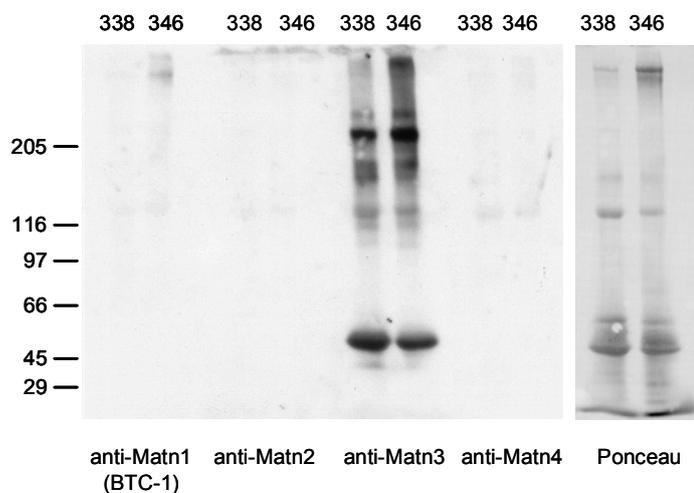
Die Ergebnisse zeigten, dass alle rekombinant exprimierten und aus Gewebe extrahierten Matriline proteolytisch prozessiert werden. Die Beobachtung zusätzlicher Matrilinfragmente in Gewebeextrakten deutete darauf hin, dass die Heterogenität durch alternatives Spleißen oder eine bislang unbekannte Art der Prozessierung erweitert wird.

### 3.1.2 Matrilin in Knorpelextrakten von Patienten mit Osteoarthritis

Osteoarthritis ist eine degenerative Gelenkerkrankung, bei der ein übermäßiger Abbau von Proteinen der extrazellulären Matrix des Knorpels stattfindet. In humanen Gelenkknorpelextrakten zeigten Matrilin-1, -2 und -3 nach SDS-PAGE heterogene

Bandenmuster, die denen der prozessierten murinen Matriline sehr ähnlich waren. Ein Vergleich der Heterogenität der Matriline in Extrakten aus gesundem und arthrotischem menschlichen Knorpel ergab keine Unterschiede für Matrilin-1 und -2 (Klatt, Dissertation 2001). Die Fragmentierungsmuster von Matrilin-3 hingegen waren in arthrotischem Gewebe verändert, was auf eine verstärkte Prozessierung schließen ließ (Pullig *et al.*, 2002).

Daher wurden Extrakte aus Gelenkknorpeln von zwei weiteren Patienten mit Osteoarthritis auf proteolytische Modifikation der Matriline untersucht. Die Erstellung und Vorreinigung der Extrakte, sowie die Lyophilisierung der extrahierten Proteine führte Dr. O. Pullig (Universität Erlangen) durch. Die lyophilisierten Proteine wurden in SDS-Auftragspuffer resuspendiert, auf einem 4-12% SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Anschließend wurden die Matriline mit ungereinigten Antiseren detektiert, um eine höhere Kreuzreaktivität der Antikörper mit humanen Matrilinen zu gewährleisten.



**Abb. 3.3: Matriline in Gelenkknorpelextrakten zweier Patienten mit Osteoarthritis.** Je 40 µg vorgereinigtes lyophilisiertes Proteinextrakt aus Knorpel zweier Patienten mit Osteoarthritis (Patient 338 bzw. 346) wurde auf einem 4-12% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Nach reversibler Färbung mit Ponceau S wurden die Matriline mit spezifischen Antiseren detektiert.

Die Extrakte der beiden untersuchten Patienten 338 und 346 enthielten keine nachweisbaren Mengen an Matrilin-1, -2 oder -4. Matrilin-3 konnte dagegen in einer Vielzahl von Proteinbanden detektiert werden (s. Abb. 3.3). Eine Bande bei ca. 220 kDa repräsentierte das Tetramer, im Bereich der prozessierten Tri- (bei ca. 160 kDa) und Dimere (bei ca. 110 kDa) wurden jeweils Doppelbanden detektiert. Dies bestätigte,

dass auch humanes Matrilin-3 nach bekanntem Muster proteolytisch prozessiert wird, jedoch wie bei murinem Matrilin-3 in SDS-PAGE von Knorpelextrakten weitere Banden zu erkennen sind. Eine zusätzliche Bande im Bereich von 50-60 kDa war, aufgrund einer starken Ponceau-Färbung im selben Bereich der Membran, möglicherweise auf eine Kreuzreaktivität des nicht affinitätsgereinigten Antiserums mit anderen Proteinen zurückzuführen.

## **3.2 Bestimmung der Prozessierungsstellen in der Scharnierregion der Matriline**

Ausgehend von den in Abschnitt 3.1 beschriebenen Ergebnissen war anzunehmen, dass das Vorkommen verschiedener oligomerer Formen aller Matriline Folge einer proteolytischen Prozessierung ist. Massenspektrometrische Analysen des Fragmentierungsmusters von rekombinantem Matrilin-3 zeigten, dass die Spaltung wie bei Matrilin-4 in der C-terminalen Scharnierregion stattfindet (Klatt, Dissertation, 2001). Die Spaltung fand bei Matrilin-4 C-terminal von zwei in allen Matrilinen konservierten Glutamatresten statt (Klatt *et al.*, 2001). Für Matrilin-3 war es nicht möglich, die Spaltstelle exakt zu bestimmen, da aufgrund der N-terminalen Markierung des Proteins die C-terminalen prozessierten Fragmente nicht angereichert werden konnten (Klatt, Dissertation, 2001).

### **3.2.1 Charakterisierung der potentiellen Proteaseschnittstelle durch Austausch der konservierten Glutamatreste in der Scharnierregion der Matriline**

Um zu untersuchen, ob es sich bei dem in allen Matrilinen vorhandenen Dublett aus Glutamatresten tatsächlich um eine konservierte Erkennungssequenz für Proteasen handelt, wurden rekombinante Matriline hergestellt, bei denen das „EE“-Motiv durch ortsspezifische *in vitro* Mutagenese gegen zwei Alanin- oder Glutaminreste ausgetauscht wurde. Zur optimalen Vergleichbarkeit mit den unveränderten Matrilinkonstrukten sollten diese mutierten Matrilin-Volllängekonstrukte ebenfalls mit C-terminaler StrepII-Markierung in 293EBNA Zellen exprimiert werden.

Die mutierten Matrilin-1, -2 und -3 Konstrukte wurden vorab erstellt und lagen im Klonierungsvektor pBluescriptII KS vor (*matn-1mAA*, *matn-2mAA*, *matn3mQQ*; Ehlen, Diplomarbeit 2002). Sie wurden über ihre *NotI* und *SpeI* Restriktionsschnittstellen in den mit *NotI* und *NheI* geschnittenen Vektor pCEP-Pu C-strep kloniert und 293EBNA Zellen wurden mit den aufgereinigten Plasmiden transfiziert. Anschließend erfolgte

eine zwei- bis dreiwöchige Selektion mit Puromycin. Zelllinien, die stabil die mutierten Matrilin-4 Proteine exprimieren (M4AA bzw. M4QQ), waren bereits vor Beginn dieser Arbeit generiert worden (Ehlen, Diplomarbeit 2002). Eine Übersicht über die erstellten Konstrukte und die in ihnen erzeugten Mutationen gibt Tabelle 3.1.

**Tabelle 3.1: Übersicht der in 293EBNA Zellen rekombinant exprimierten Matrilinkonstrukte und ihre in dieser Arbeit verwendeten Bezeichnungen.**

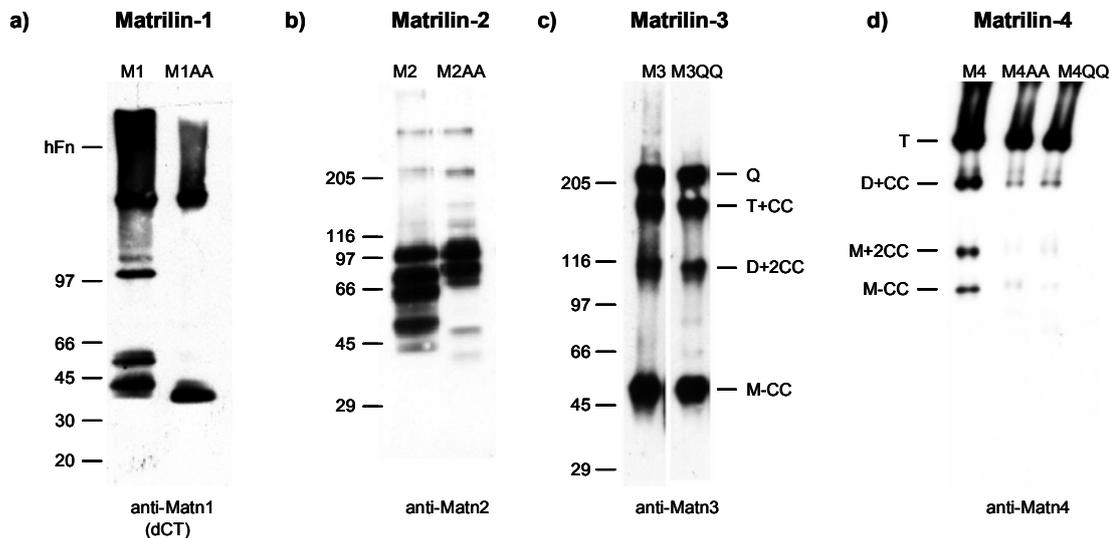
	eingeführte Mutation	Bezeichnung Konstrukt	Bezeichnung Protein
Matrilin-1	Wildtyp	<i>matn1</i>	M1
Matrilin-1	<sup>453</sup> EE→AA	<i>matn1</i> mAA	M1AA
Matrilin-2	Wildtyp	<i>matn2</i>	M2
Matrilin-2	<sup>910</sup> EE→AA	<i>matn2</i> mAA	M2AA
Matrilin-3	Wildtyp	<i>matn3</i>	M3
Matrilin-3	<sup>429</sup> EE→QQ	<i>matn3</i> mQQ	M3QQ
Matrilin-4	Wildtyp	<i>matn4</i>	M4
Matrilin-4	<sup>571</sup> EE→AA	<i>matn4</i> mAA	M4AA
Matrilin-4	<sup>571</sup> EE→QQ	<i>matn4</i> mQQ	M4QQ

Für Matrilin-4 wurde bereits gezeigt, dass der Austausch der konservierten Glutamatreste gegen Alanin- oder Glutaminreste in beiden Fällen zu einer signifikanten Verringerung der proteolytischen Prozessierung führte, sie jedoch nicht vollständig ausschalten konnte. Die Auswahl der Mutation, Alanin oder Glutamin, machte dabei keinen Unterschied, daher wurde bei der Generierung der mutierten Matrilin-1, -2 und -3 Konstrukte jeweils die Mutation gewählt, die bei der Klonierung technisch einfacher durchzuführen war. Nach Reduktion der affinitätsgereinigten Proteine M4, M4AA und M4QQ differierten die im MALDI-TOF ermittelten Massen der prozessierten *coiled-coil* Domänen untereinander um maximal 4,3 Dalton, so dass davon auszugehen ist, dass auch die mutierten Matrilin-4 Proteine an der gleichen Position wie das wildtypische Protein gespalten werden (Ehlen, Diplomarbeit, 2002).

Zur Klärung, ob alle Matrilin C-terminal der konservierten Glutamatreste prozessiert werden, wurden die Bandenmuster der mutierten Proteine in SDS-PAGE-Analysen mit den Bandenmustern der entsprechenden wildtypischen Matrilin verglichen.

Matrilin-1 konnte nach Mutagenese der potentiellen Proteaseschnittstelle nahezu ausschließlich als unprozessiertes Trimer detektiert werden (s. Abb. 3.4a). Die bei wildtypischem Matrilin-1 (M1) beobachteten Dimere im Bereich von 100-110 kDa waren beim mutierten Protein (M1AA) nicht mehr nachweisbar. Dies zeigte, dass diese Dimere bei Matrilin-1 durch proteolytische Prozessierung entstehen und das

konservierte „EE“-Motiv als Erkennungssequenz für die verantwortliche(n) Protease(n) dient. Ein weiteres Fragment des Proteins M1AA bei ca. 40 kDa hatte ein leicht geringeres apparentes Molekulargewicht als beim Wildtyp, wurde jedoch nicht weiter charakterisiert.



**Abb. 3.4: Vergleich von Matrilinen mit wildtypischem oder mutiertem „EE“-Motiv.** Konditionierte Überstände von 293EBNA Zellen, die rekombinant Matrilin-1 (a), -2 (b) -3 (c) oder -4 (d) mit wt (M1, M2, M3, M4) oder mutiertem (M1AA, M2AA, M3QQ, M4AA, M4QQ) „EE“-Motiv exprimieren, wurden auf 4-15% SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembranen erfolgte eine Detektion mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen die entsprechenden Proteine. Molekulargewichts-Standards in kDa, hFn=humanes Fibronectin. Zur Nomenklatur der prozessierten Matrilin-Oligomere s. Fußnote1 (Seite 7).

In konditionierten Überständen von Zellen, die wildtypisches (M2) oder mutiertes (M2AA) Matrilin-2 exprimieren, waren intakte, unprozessierte Oligomere, ebenso wie prozessierte Di- und Monomere, nur schwach detektierbar (s. Abb. 3.4b). Eine Proteinbande bei 97 kDa repräsentierte potentiell abgeschnittene Monomere ohne *coiled-coil* Domäne. Weiterhin konnten Matrilin-2 Epitope in einer Vielzahl von Proteinbanden im Bereich von 40-100 kDa nachgewiesen werden, die nicht mit dem anti-Strep Antikörper reagierten (vgl. Abb. 3.1). Ein ähnliches Fragmentierungsmuster wurde in murinen Uterusextrakten beobachtet (Piecha *et al.*, 1999). Eine Anreicherung und weitere Charakterisierung dieser Fragmente war bei rekombinant exprimiertem Matrilin-2 jedoch nicht möglich, da die C-terminale Markierung verloren gegangen war. Matrilin-2 mit mutiertem „EE“-Motiv (M2AA) zeigte eine deutlich reduzierte Heterogenität des Fragmentierungsmusters. Eine Bande bei ca. 60 kDa fehlte nach Mutagenese vollständig, zwei weitere Banden von M2 bei ca. 42 bzw. 50 kDa waren in

M2AA-haltigen Überständen deutlich schwächer nachweisbar und hatten leicht geringere apparente Molekulargewichte.

Die Vereinfachung des Fragmentmusters nach Mutagenese des konservierten „EE“-Motivs belegt, dass diese Schnittstelle auch bei Matrilin-2 genutzt wird. Zudem ist davon auszugehen, dass alternative Prozessierungsstellen existieren, da intakte und prozessierte höhere Oligomere in M2- und M2AA-haltigen Überständen in vergleichbaren Mengen vorhanden waren, obwohl die konservierte Spaltstelle ausgeschaltet werden konnte.

Bei Matrilin-3 und -4 waren die Prozessierungsmuster der rekombinanten wildtypischen Proteine und der entsprechenden „EE“-Mutanten jeweils identisch. Prozessierte Matrilin-4 Di- und Monomere waren in Überständen von M4-, M4AA- oder M4QQ-exprimierenden Zellen vorhanden, bei den beiden mutierten Versionen des Proteins dagegen in deutlich geringerer Menge als bei wildtypischem Matrilin-4 (s. Abb. 3.4d). Damit wurden frühere Ergebnisse bestätigt, nach denen das konservierte „EE“-Motiv in Matrilin-4 als Protease-Erkennungssequenz dient. (Ehlen, Diplomarbeit, 2002).

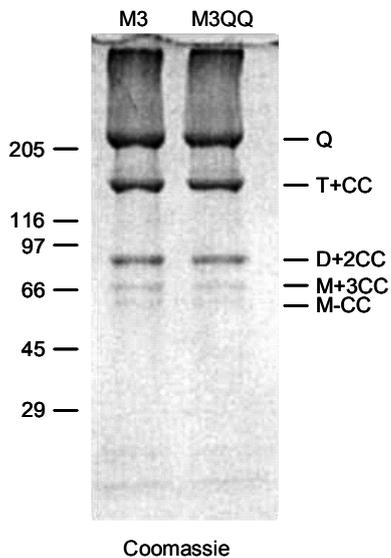
Im Fall von Matrilin-3 hatte der Austausch des „EE“-Motivs gegen zwei Glutaminreste keinen Einfluss auf das Ausmaß der Prozessierung. Ein Vergleich der Proteine M3 und M3QQ im Immunoblot nach SDS-PAGE zeigte, dass intakte Tetramere (Q) und prozessierte Tri- (T+CC), und Dimere (D+2CC) sowie abgeschnittene Monomere (M-CC) bei beiden Varianten des Proteins in vergleichbaren Mengen vorhanden waren (s. Abb. 3.4.c).

#### **3.2.2 Bestimmung der Prozessierungsstelle von rekombinantem Matrilin-3**

Matrilin-3 ist der einzige Vertreter der Matrilinfamilie, bei dem die Mutagenese der potentiellen Proteaseschnittstelle ohne Effekt blieb. Die Erkenntnisse, die durch SDS-PAGE- und MALDI-TOF-Analysen von rekombinanten Matrilin-3 Proteinen mit unterschiedlichen Markierungen gewonnen wurden (s. Abb. 3.4c; Klatt, Dissertation, 2001), führten jedoch zu dem Schluss, dass auch dieses Matrilin in der C-terminalen Scharnierregion proteolytisch prozessiert wird. Daher sollte untersucht werden, ob bei Matrilin-3 alternative Schnittstellen in der Scharnierregion vorhanden sind.

Dazu wurden die rekombinanten, C-terminal StrepII-markierten Proteine M3 und M3QQ zunächst über Streptactin-Sepharose affinitätsgereinigt und die Reinheit der eluierten Proteine in einer SDS-PAGE mit Coomassie Färbung dokumentiert (s. Abb. 3.5). Beide Proteine waren in vergleichbarem Ausmaß prozessiert worden, was die

Ergebnisse des Immunoblots der konditionierten M3 und M3QQ Zellkulturüberstände (s. Abb. 3.4c) bestätigte.



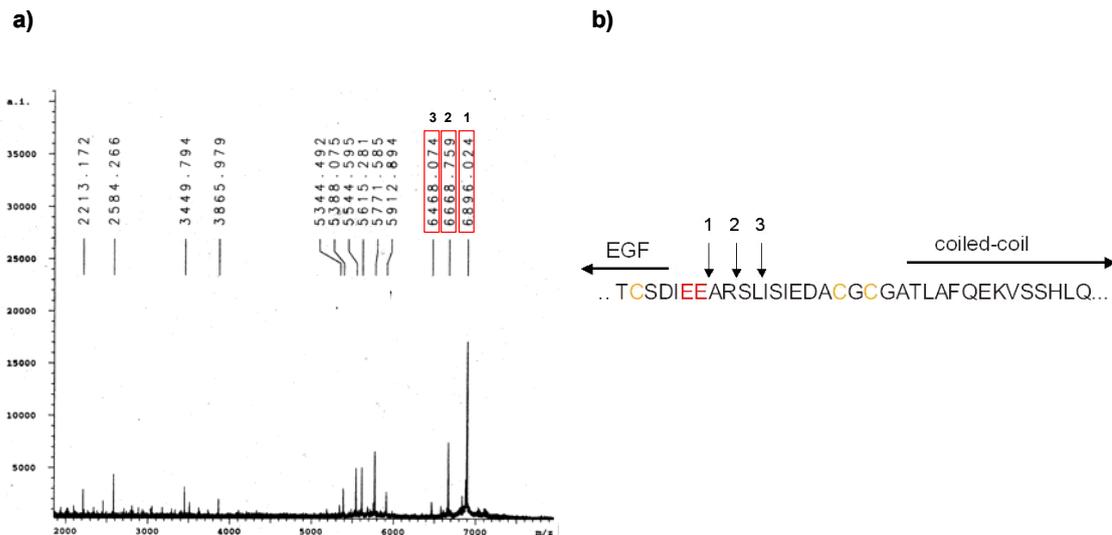
**Abb. 3.5: SDS-PAGE Analyse von affinitätsgereinigtem Matrilin-3 mit wildtypischem oder mutiertem „EE“-Motiv.**

Rekombinantes, C-terminal StrepII-markiertes Matrilin-3 mit wildtypischem (M3) oder mutiertem (M3QQ) „EE“-Motiv wurde aus konditionierten Überständen transfizierter 293EBNA Zellen affinitätsgereinigt und auf einem 4-12% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Färbung der Proteine im Gel erfolgte mit Coomassie brilliant blue.

Zur massenspektrometrischen Analyse der prozessierten Matrilin-3 *coiled-coil* Domäne wurde affinitätsgereinigtes, C-terminal StrepII-markiertes Matrilin-3 mit DTT reduziert, die freien SH-Gruppen der Cysteine mit Iodacetamid alkyliert und der Massenbereich zwischen 2000 und 8000 Da im MALDI-TOF untersucht. Das Spektrum zeigte neun Molekülionensignale zwischen 5300 und 6900 Da und vier weitere zwischen 2200 und 3900 Da (s. Abb. 3.6a).

Ein gemessenes Molekülion von 6896 Da entsprach der theoretischen Masse der alkylierten *coiled-coil* Domäne (ohne das C-terminale Arginin) nach einer proteolytischen Prozessierung C-terminal der konservierten Glutamatreste (theor. 6894,5 Da;  $^{429}\text{EE}\downarrow\text{ARSLISIEDA}\dots$ ; s. Abb. 3.6). Zwei weitere gemessene Molekülionen von 6668,8 Da und 6468,1 Da entsprachen den theoretischen Massen von Fragmenten, die in C-terminaler Richtung entweder zwei (theor. 6667,4 Da;  $^{431}\text{AR}\downarrow\text{SLISIEDA}\dots$ ) oder vier Aminosäurereste (theor. 6467,3 Da;  $^{433}\text{SL}\downarrow\text{ISIEDA}\dots$ ) hinter der konservierten Schnittstelle „EE“ prozessiert werden, unter der Annahme, dass das C-terminale Arginin fehlt. Das Fehlen des C-terminalen Arginins der StrepII-Markierung wurde bereits in massenspektrometrischen Analysen von rekombinant exprimiertem Matrilin-4 beobachtet (Klatt *et al.*, 2001).

Ein Signal bei 3449 Da entsprach dem zweifach protonierten Molekülion von 6896 Da, neun weitere verhältnismäßig schwache Signale konnten nicht zugeordnet werden.



**Abb. 3.6: Bestimmung der Matrilin-3 Prozessierungsstelle.** **a)** Massenspektrum der prozessierten *coiled-coil* Domäne von rekombinantem, C-terminal StrepII-markiertem Matrilin-3 nach Reduktion mit DTT und Alkylierung mit Iodacetamid. Rot markierte Molekülionensignale entsprechen den theoretischen Molekulargewichten alternativ prozessierter Fragmente. **b)** Schematische Darstellung der Matrilin-3 Scharnierregion zwischen der vierten EGF-ähnlichen und der C-terminalen *coiled-coil* Domäne. Durch MALDI-TOF Analyse vorhergesagte Schnittstellen sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die konservierten Glutamatreste sind rot, Cysteinreste in gelb dargestellt

Zur eindeutigen Bestimmung der Schnittstellen von Matrilin-3 mit wildtypischem (M3) und mutiertem (M3QQ) „EE“-Motiv durch N-terminale Sequenzierung der Prozessierungsprodukte wurden die rekombinanten Proteine erneut über die C-terminale StrepII-Markierung affinitäts gereinigt. Diesmal wurde den Elutionspuffern ein Proteaseinhibitorcocktail („*Complete protease inhibitor tablets*“ (Roche), sowie PMSF und NEM) zugesetzt, um artifizielle Spaltungen aufgrund möglicher Kontaminationen durch Proteasen auszuschließen. Nach Reduktion der Proteine mit DTT wurden die reduzierten Cysteinreste mit Acrylamid alkyliert, um ihre Detektion bei der Sequenzierung zu ermöglichen. Anschließend wurden die Proteine auf einem 8-20% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Durch Färbung der Membran mit Coomassie brilliant blue konnten die prozessierten *coiled-coil* Domänen von M3 und M3QQ jeweils als eine Proteinbande bei ca. 6 kDa sichtbar gemacht werden. Die Banden wurden ausgeschnitten und die zehn N-terminalen Aminosäurereste der Proteine durch Sequenzierung nach Edman bestimmt.

Die Sequenzierung der *coiled-coil* Domäne des wildtypischen Proteins M3 ergab die Sequenz (A/S) (R/L) (S/I) L I (S/E) (I/D) E D A. In den Zyklen 1, 2, 3, 5 und 6 wurden jeweils zwei unterschiedliche Aminosäurereste bestimmt. Anhand deutlicher

Unterschiede in den Intensitäten der Signale in diesen Zyklen konnte zwischen den zwei Sequenzen <sup>431</sup>ARSLISIEDA und <sup>433</sup>SLI--ED--- unterschieden werden (s. Abb. 3.7a). Die Sequenzierungsergebnisse zeigten eindeutig, dass zum einen eine Prozessierung C-terminal der konservierten Glutamatreste erfolgt und zum anderen eine zusätzliche Spaltstelle C-terminal des Aminosäurerestes Arg<sup>432</sup> existiert.

	Zyklus:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Spaltstelle:
a)		<hr/>										
	M3	A	R	S	L	I	S	I	E	D	A	<sup>429</sup> EE↓ARSLISIEDA...
		S	L	I	-	I	E	D	-	-	-	<sup>429</sup> EEAR↓SLISIEDA...
b)		<hr/>										
	M3QQ	D	T	H	K	K/S	E	E	A	A	H/R	<sup>429</sup> QQ↓ARSLISIEDA...
		A	R	S	L	I	S	I	-	D	A	<sup>429</sup> QQAR↓SLISIEDA...

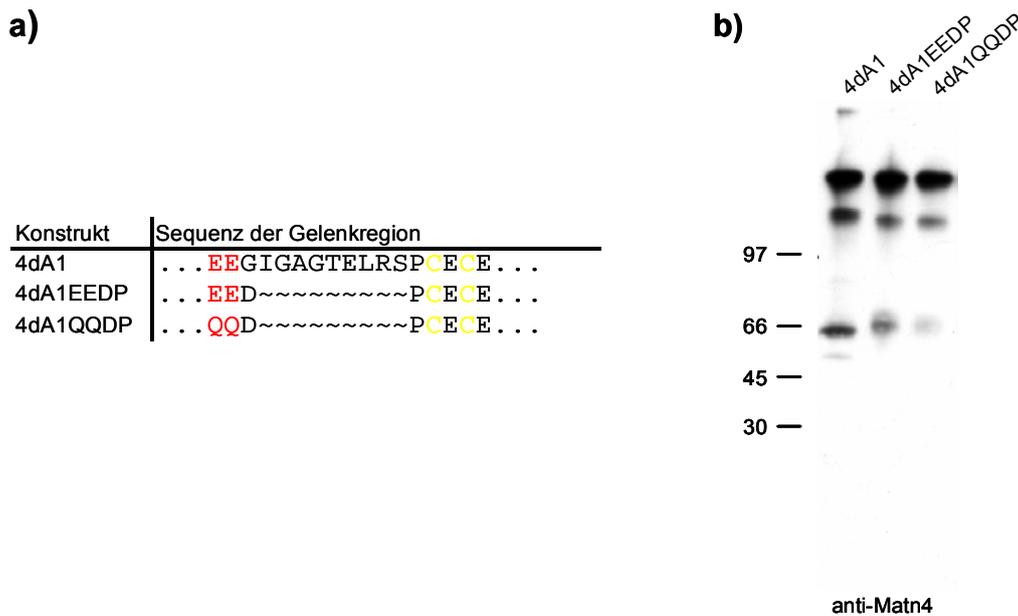
**Abb. 3.7: N-terminale Sequenzierung der prozessierten *coiled-coil* Domäne von M3 und M3QQ zur Bestimmung der Matrilin-3 Prozessierungsstellen.** Die Aminosäuresequenzen der prozessierten *coiled-coil* Domänen der Proteine M3 (a) und M3QQ (b) nach Reduktion und Alkylierung wurden durch Edman-Abbau bestimmt. Unterschiedliche, im selben Zyklus ermittelte Aminosäurereste, wurden anhand ihrer relativen Signalintensitäten geordnet, so dass jeweils mehrere Sequenzen ermittelt und die entsprechenden Schnittstellen in der Matrilin-3 Scharnierregion bestimmt werden konnten. Aminosäurereste aus dem gleichen Zyklus, die zu mehreren Sequenzen passen, sind in grüner Schrift dargestellt.

Die Ergebnisse der Sequenzierung der prozessierten *coiled-coil* Domäne des Proteins M3QQ ergab (D/A/S) (T/R/L) (H/S/I) (K/L) (K/S/I) (E/S) (E/I) A (A/D) (H/R/A). Durch Vergleich der Signalintensitäten konnten die Sequenzen <sup>431</sup>ARSLISI-DA und <sup>433</sup>SLI----- ermittelt werden (s. Abb. 3.7b). Die Prozessierung von Matrilin-3 mit mutierter Schnittstelle erfolgte also trotz des Aminosäureaustausches <sup>429</sup>EE→QQ an den gleichen Positionen wie beim rekombinanten wildtypischen Protein. Die stärksten Signale ergaben die Sequenz DTHK(K/S)EEAA(H/R), die in Datenbankrecherchen keiner bekannten Proteinsequenz zugeordnet werden konnte. Möglicherweise handelt es sich dabei um ein synthetisches Peptid aus dem verwendeten Proteaseinhibitorcocktail. Leider verweigerte der Hersteller (Roche) die Beantwortung einer diesbezüglichen Nachfrage.

### 3.2.3 Klonierung und rekombinante Expression verkürzter Matrilin-4 Proteine mit Matrilin-1 Scharnierregion

Betrachtet man das Ausmaß der proteolytischen Prozessierung der vier Matriline, so ist ein Zusammenhang mit der Länge der Sequenz der jeweiligen Scharnierregion möglich. Matrilin-1 mit der kurzen Scharnierregion „EEDP“ wird nur sehr schwach prozessiert, Matrilin-2, dessen Scharnierregion inklusive der *unique*-Domäne 80 Aminosäurereste umfasst, hingegen am stärksten. Um diesen Zusammenhang näher zu untersuchen, wurden verkürzte Matrilin-4 Proteine mit wildtypischer oder mutierter Proteaseschnittstelle exprimiert, bei denen die Sequenz der Matrilin-4 Scharnierregion „GIGAGTELRSP“ durch die kurze Matrilin-1 Sequenz „DP“ ersetzt wurde (s. Abb. 3.8a). Um den Versuch zu vereinfachen wurde die VWA1-Domäne jeweils weggelassen. Als Positivkontrolle wurde daher ein um die VWA1-Domäne verkürztes Matrilin-4 Protein mit unveränderter Scharnierregion konstruiert, das der kürzeren Spleißvariante entspricht (Wagener *et al.*, 1998a)

Zur Generierung dieses wildtypischen Konstrukts (4dA1) ohne VWA1-Domäne wurde anhand einer cDNA von murinem Matrilin-4 ein 1,3 kb Fragment per PCR amplifiziert. Dabei wurde eine *SpeI*-Restriktionsschnittstelle am 5'- und eine *BamHI*-Schnittstelle am 3'-Ende eingeführt, über die eine Klonierung in den Expressionsvektor pCEP-Pu V27 erfolgte. Dieser Vektor enthält die Sequenz für das BM40-Signalpeptid am 5'- und die Sequenz für eine 8xHis-Markierung am 3'-Ende der Klonierungsstelle, um rekombinante Fusionsproteine mit einer C-terminalen Histidin-Markierung zu exprimieren. Die Erstellung der Matrilin-4 Konstrukte mit Matrilin-1 Scharnierregion und wildtypischer (4dA1EEDP) oder mutierter (4dA1QQDP) Proteaseschnittstelle erfolgte durch jeweilige PCR-Amplifikation eines 1,1 kb langen 5'-Fragments und eines 165 bp langen 3'-Fragments, deren 5'- und 3-Enden überlappten. Dabei wurde eine neue *NdeI*-Restriktionsschnittstelle in der Nähe der erwünschten Mutationen eingeführt. Zusätzlich eingeführte *SpeI*- bzw. *BamHI*-Schnittstellen erlaubten die Klonierung der Konstrukte in den Vektor pCEP-Pu V27. Das Auftreten unerwünschter Mutationen wurde durch nachfolgende DNA-Sequenzierung der Konstrukte ausgeschlossen. Nach Transfektion der Konstrukte in 293EBNA Zellen wurden die Prozessierungsmuster der rekombinanten Proteine im Immunoblot untersucht.



**Abb. 3.8: Prozessierung von Matrilin-4 Proteinen mit endogener oder verkürzter Scharnierregion. a)** Schematische Darstellung der Sequenz der Scharnierregion der drei Matrilin-4 Konstrukte mit endogener (4dA1) oder Matrilin-1 Scharnierregion mit wildtypischer (4dA1EEDP) oder mutierter (4dA1QQDP) Proteaseschnittstelle. **b)** Die rekombinanten Proteine wurden in 293EBNA Zellen exprimiert. Die konditionierten Überstände auf einem 6-15% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Detektion erfolgte mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen Matrilin-4.

Alle drei Proteine werden nach bekanntem Muster proteolytisch prozessiert. Trimere (bei ca. 140 kDa), prozessierte Dimere (bei ca. 100 kDa) und prozessierte Monomere (bei ca. 66 kDa) der Proteine 4dA1EEDP und 4dA1QQDP zeigten im SDS-PAGE geringe Laufunterschiede zu den entsprechenden Fragmenten der Positivkontrolle 4dA1 (s. Abb. 3.8b). Ein Vergleich der Signalintensitäten der prozessierten Oligomere zeigte, dass bei einer verkürzten Scharnierregion das Ausmaß der Prozessierung leicht verringert wird. Die Mutation des konservierten Motivs „EE“ zu „QQ“ verstärkte diesen Effekt deutlich. Dieses Ergebnis wurde in zwei weiteren, unabhängigen Experimenten nach selbem Schema, bestätigt.

### 3.3 Untersuchungen zum Mechanismus der Prozessierung von Matrilin-4

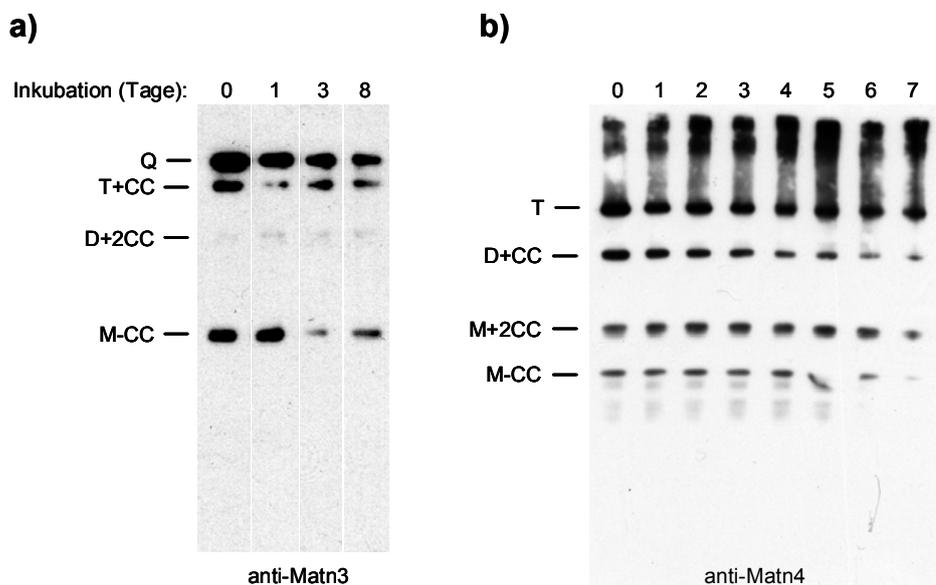
Prinzipiell sind zwei verschiedene Mechanismen vorstellbar, nach denen die proteolytische Prozessierung der Matriline abläuft. Eine Möglichkeit ist, dass die Prozessierung von sekretierten Proteasen in der extrazellulären Matrix durchgeführt wird. Damit könnten die Bindungseigenschaften der Matriline nachträglich verändert

werden. Die zweite Möglichkeit ist, dass Matrilin bereits vor oder während ihrer Sekretion in intrazellulären Kompartimenten des sekretorischen Transportweges prozessiert werden. In diesem Fall würde die proteolytische Prozessierung eine posttranslationale Modifikation darstellen, die es einer Zelle ermöglicht, die Eigenschaften neu synthetisierter Matrilin zu verändern.

Um einen Einblick in den Mechanismus der Prozessierung zu bekommen, sollte durch die Verfolgung verschiedener experimenteller Ansätze geklärt werden, ob die Spaltung intra- oder extrazellulär stattfindet und welche Proteasen an diesem Prozess beteiligt sind. Dabei fokussierten die Untersuchungen auf die Prozessierung von Matrilin-4, da deren Charakterisierung bereits weiter fortgeschritten war.

### 3.3.1 Inkubation von Zellkulturüberständen

Im Fall einer extrazellulären Prozessierung der Matrilin wäre davon auszugehen gewesen, dass sich die verantwortliche Protease im extrazellulären Milieu befindet. Daher wurden Überstände von 293EBNA Zellen, die Matrilin-3 oder -4 rekombinant exprimieren, zum Nachweis einer möglichen extrazellulär wirkenden proteolytischen Aktivität geerntet und die Zellen abzentrifugiert. Die konditionierten Überstände wurden daraufhin bis zu acht Tage bei 37°C inkubiert und die Matrilin-3 oder -4 Fragmentierungsmuster im Immunoblot untersucht.



**Abb. 3.9: Inkubation zellfreier konditionierter Überstände bei 37°C.** Zellfreie konditionierte Überstände Matrilin-3- (a) oder -4 (b) exprimierender 293EBNA Zellen wurden bis zu acht Tage bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine auf 4-15% SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und durch Detektion mit Antikörpern gegen Matrilin-3 oder -4 nachgewiesen.

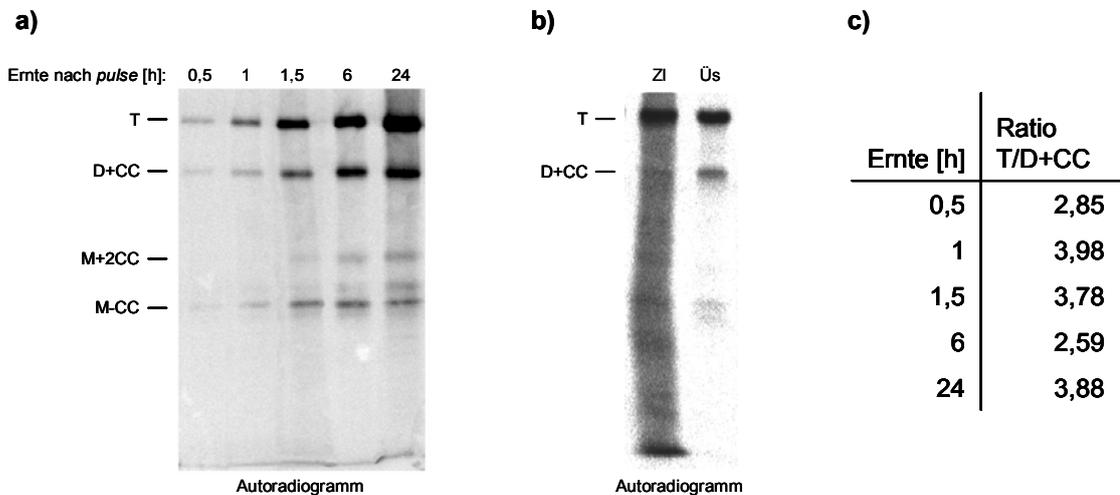
Eine längere Inkubation der konditionierten Überstände führte nicht zu einer Veränderung der Mengenverhältnisse der prozessierten Matrilin-3 oder -4 Fragmente (s. Abb. 3.9). Eine proteolytische Aktivität, die zu einer fortschreitenden Prozessierung der Matrilin führen würde, konnte in den Überständen nicht nachgewiesen werden. Bei beiden untersuchten Matrilinen wurden die Signale aller Banden über den gesamten Verlauf des Experiments schwächer, was auf die Präzipitation der Proteine im Medium zurückzuführen war.

### **3.3.2 Kinetische Untersuchung der Sekretion prozessierter Matrilin-4 Fragmente**

Ein weiterer Ansatz zur Klärung der Frage, wo die Prozessierung stattfindet, bestand darin, etwaige Veränderungen in den Matrilin-4 Fragmentierungsmustern kurz nach Sekretion des Proteins in das Zellkulturmedium, zu untersuchen. Dazu wurden Matrilin-4 exprimierende 293EBNA Zellen in einem *pulse-chase* Experiment in Anwesenheit von  $^{35}\text{S}$ -Methionin und  $^{35}\text{S}$ -Cystein inkubiert, um neusynthetisierte Proteine radioaktiv zu markieren. Nach der Markierung wurden die Zellen in serumfreiem Medium ohne radioaktiv markierte Aminosäuren inkubiert, die Überstände zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und die Zellen lysiert.  $^{35}\text{S}$ -markiertes Matrilin-4 wurde anschließend über Streptactin-Sepharose affinitätsgereinigt, elektrophoretisch aufgetrennt und ein Autoradiogramm des Gels erstellt. Dieses Experiment wurde bereits im Rahmen der Diplomarbeit durchgeführt und ausgewertet (Ehlen, Diplomarbeit, 2002), wird an dieser Stelle zur Vervollständigung der Daten jedoch erneut beschrieben.

Matrilin-4 wurde im Zellüberstand bereits 30 Minuten nach Sekretion als Trimer, prozessiertes Dimer (D+CC) und abgeschnittenes Monomer (M+CC) gefunden (s. Abb. 3.10a). Die Intensitäten der Banden nahmen im Zellkulturüberstand über den gesamten Zeitverlauf des Experiments zu, während sie im Zellysat bereits nach zwei Stunden schwächer wurden und nach 24 Stunden keine Matrilin-4 Banden mehr zu erkennen waren (nicht gezeigt). Da das prozessierte Monomer (M+2CC) nur in geringen Mengen im Überstand vorhanden war, konnte es erst nach 1,5 h Inkubationsdauer im Autoradiogramm erkannt werden. Eine quantitative Analyse der Intensitäten der Trimer- (T) und Dimerbanden (D+CC) zeigte, dass sich das Mengenverhältnis dieser Fragmente im Zellüberstand während der ersten 24 h nach Sekretion nicht signifikant veränderte (s. Abb. 3.10c). Weiterhin war im Autoradiogramm eines mitaufgetragenen Zellysats außer dem Trimer auch das

prozessierte Dimer schwach zu erkennen (s. Abb. 3.10b). Matrilin-4 wurde also bereits während der Sekretion proteolytisch prozessiert.



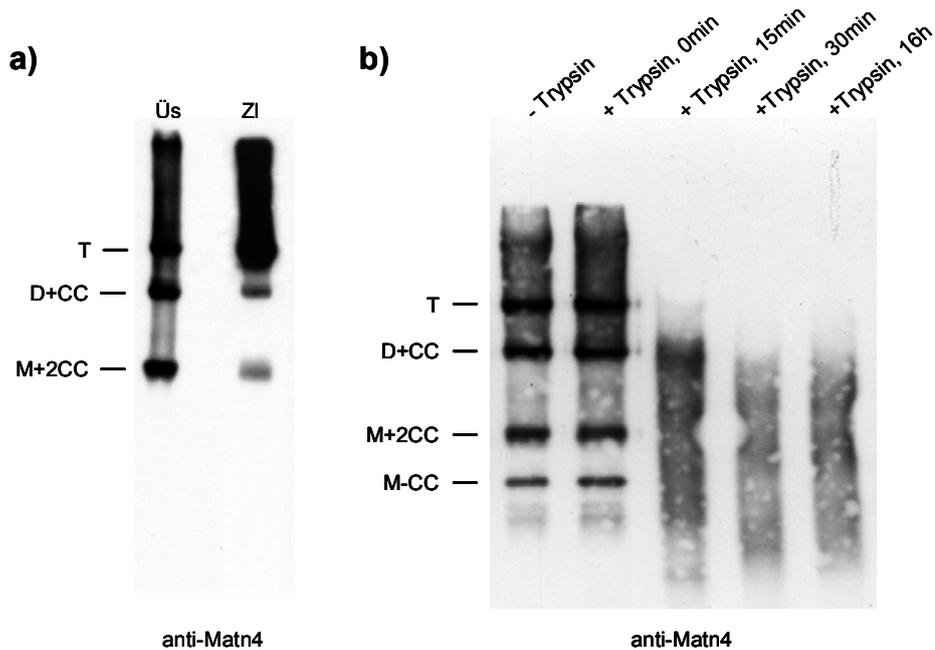
**Abb. 3.10: Pulse-chase Experiment zur Sekretionskinetik prozessierter Matrilin-4 Fragmente.** Überstände und Zelllysate rekombinant Matrilin-4 exprimierender 293EBNA Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Markierung der Proteine mit  $^{35}\text{S}$  geerntet. Anschließend wurde Matrilin-4 mit Streptactin-Sepharose präzipitiert und auf einem 4-12% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

**a)** Autoradiogramm nach Auftrennung von Matrilin-4 aus Überständen, die 0,5, 1, 1,5, 6 oder 24h inkubiert wurden. **b)** Autoradiogramm nach Auftrennung von Zelllysate (ZI) und Überstand (Üs) nach zweistündiger Inkubation. **c)** Quantitative Analyse der Trimer- (T) und Dimerbanden (D+CC) des Autoradiogramms, das in a) gezeigt ist. Abbildung verändert übernommen aus Ehlen, Diplomarbeit (2002).

### 3.3.3 Aufreinigung prozessierter Matrilin-4 Oligomere aus Zelllysaten

Die Ergebnisse der vorangegangenen Experimente ließen keine Aussage darüber zu, ob die Prozessierung von Matrilin-4 während der Sekretion bereits intrazellulär oder erst im perizellulären Raum an der Außenseite der Plasmamembran stattfindet. Deswegen wurde geprüft, ob Matrilin-4 bereits intrazellulär in prozessierter Form nachweisbar ist.

Dazu wurden Matrilin-4 exprimierende 293EBNA Zellen serumfrei kultiviert, mehrfach in PBS gewaschen und für 15 Minuten mit Trypsin verdaut, um die Zellen zu vereinzeln und eine Kontamination durch extra- oder perizellulär assoziierte Matrilin-4 Moleküle zu vermeiden. Anschließend wurden die Zellen wiederum ausgiebig gewaschen, lysiert, unlösliche Zellfragmente abzentrifugiert und Matrilin-4 aus dem Zellextrakt über Streptactin-Sepharose affinitätsgereinigt.



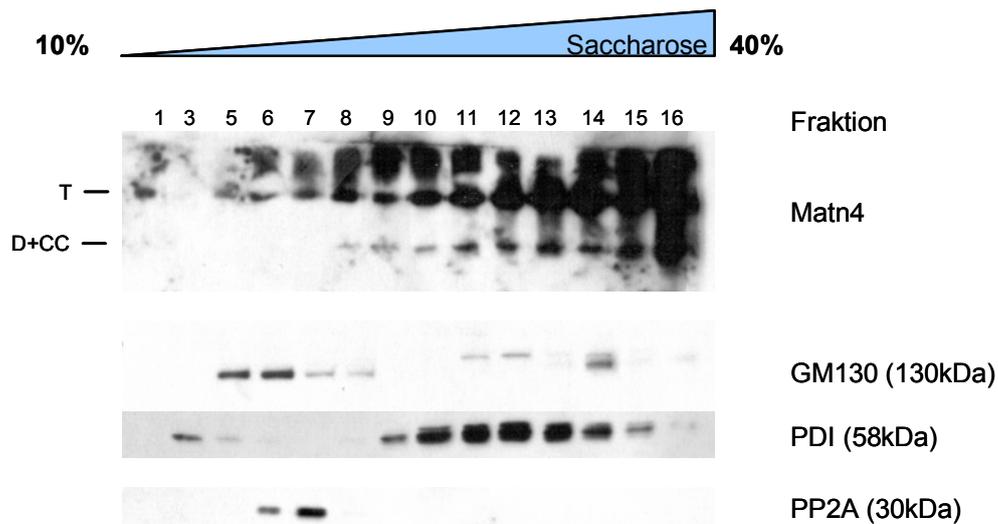
**Abb. 3.11: Nachweis intrazellulärer Prozessierungsprodukte von Matrilin-4.** a) Rekombinant exprimiertes Matrilin-4 wurde aus konditionierten Überständen (Üs) oder Lysaten von 293EBNA Zellen affinitätsgereinigt und das Fragmentierungsmuster nach Auftrennung der Proteine auf einem 4-12% SDS-Polyacrylamidgel im Immunoblot sichtbar gemacht. b) 4-12% SDS-PAGE mit nachfolgendem Immunoblot Matrilin-4-haltiger Überstände vor und nach Inkubation mit Trypsin.

Wie bei Matrilin-4, welches aus konditionierten Überständen affinitätsgereinigt wurde, waren bei Matrilin-4 aus Zelllysaten prozessierte Di- (D+CC) und Monomere (M+CC) nachweisbar (s. Abb. 3.11a). Das abgeschnittene Monomer (M-CC) konnte nicht detektiert werden, da es bei der Affinitätsreinigung verloren ging. In einem Kontrollexperiment wurde zusätzlich bestätigt, dass Matrilin-4 in Zellkulturüberständen durch 15 minütige Inkubation mit Trypsin vollständig degradiert wird (s. Abb. 3.11b), so dass eine Verfälschung der Ergebnisse durch bereits sekretiertes Protein ausgeschlossen werden konnte. Demzufolge findet die proteolytische Prozessierung von Matrilin-4 bereits intrazellulär statt und Matrilin-4 wird als ein Gemisch verschiedener prozessierter und unprozessierter Oligomere sezerniert.

### 3.3.4 Subzelluläre Lokalisation prozessierter Matrilin-4 Fragmente

Um zu identifizieren, in welchem intrazellulären Kompartiment des sekretorischen Transportweges Matrilin-4 zuerst prozessiert wird, wurde eine subzelluläre Fraktionierung Matrilin-4 exprimierender 293EBNA Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden aufgeschlossen und Plasmamembranfragmente, Zellkerne und Mitochondrien durch Zentrifugation sedimentiert. Der Überstand wurde auf einen 10-40% Saccharosegradienten aufgetragen und die Zellkompartimente durch isopyknische

Zentrifugation aufgetrennt. Danach wurden die Zentrifugenröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren, aufgesägt und die gefrorene Saccharoselösung in ca. 5 mm dicke Scheiben geschnitten, so dass 16 Fraktionen gewonnen wurden. Die Dokumentation der Fraktionierung erfolgte durch immunologischen Nachweis von Matrilin-4, dem im endoplasmatischen Retikulum lokalisierten Enzym Proteindisulfidisomerase (PDI), dem Golgi-Protein GM130 und der cytoplasmatisch lokalisierten Phosphatase PP2A im *western blot*.



**Abb. 3.12: Subzelluläre Fraktionierung Matrilin-4 exprimierender EBNA Zellen.** Das Zellhomogenisat wurde in einem 10-40% Saccharosegradienten durch isopyknische Zentrifugation separiert und die Proteine der Fraktionen auf einem 4-15% SDS-Polyacrylamidgel (Matrilin-4), oder nach Reduktion auf 10% (GM130) oder 12% (58K, PP2) SDS-Polyacrylamidgelen, aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf Nitrozellulose erfolgte eine Detektion mit spezifischen Antikörpern gegen Matrilin-4 (Matn4), das Golgi-Protein GM130, das ER Protein Proteindisulfidisomerase (PDI) und die cytoplasmatische Phosphatase PP2A.

Die Immunoblots zeigten, dass die Golgi-Kompartimente in den Fraktionen 5-8 angereichert werden konnten (s. Abb. 3.12). Die schwache obere, von den anti-GM130 Antikörpern detektierte Bande in den Fraktionen 11-16 war unspezifisch. Das endoplasmatische Retikulum ließ sich hauptsächlich in Fraktionen höherer Dichte (Fraktionen 9-15) nachweisen, während das vornehmlich cytoplasmatisch lokalisierte Protein PP2A nur in den Fraktionen 6 und 7 zu finden war. Matrilin-4 Trimere befanden sich in den Fraktionen 5-16, prozessierte Dimere (D+CC) waren in den Fraktionen 8-16 nachweisbar. Die Intensität der beiden Matrilin-4 Banden nahm mit steigender Saccharosekonzentration stetig zu, wobei das Mengenverhältnis von Tri- zu Dimer in allen Fraktionen auf vergleichbarem Niveau war. Daher ist es wahrscheinlich, dass auch in den Fraktionen 5-7 prozessierte Dimere enthalten waren, ihre Menge jedoch

unter der Nachweisgrenze lag. Um vor der Dichtegradientenzentrifugation einen hinreichenden Aufschluss der Zellen zu gewährleisten, konnten die Zellen nicht mit Trypsin behandelt werden. Daher war nicht vollständig auszuschließen, dass die Fraktionen 14-16 möglicherweise noch unlösliche Zellfragmente enthalten, die zuvor nicht durch Sedimentation entfernt werden konnte.

Durch die subzelluläre Fraktionierung konnte endoplasmatisches Retikulum von Golgi-Kompartimenten und Cytosol abgetrennt werden. Matrilin-4 war in nahezu allen Fraktionen in prozessierter Form zu finden und prozessierte Dimere wurden mit einem Protein des endoplasmatischen Retikulums kolokalisiert. Daher scheint die proteolytische Prozessierung von Matrilin-4 eine posttranslationale Modifikation zu sein, die bereits sehr früh während der Sekretion im endoplasmatischen Retikulum stattfindet.

#### **3.4 Versuche zur Identifikation von Proteasen, die Matrilin-4 spalten**

Zwei unterschiedliche Strategien wurden verfolgt, um Matrilin-4 spaltende Proteasen zu identifizieren. Zunächst sollten *in silico* potentielle Kandidaten identifiziert werden. Wenn möglich, sollte Matrilin-4 dann mit den entsprechenden Proteasen koexprimiert oder direkt inkubiert werden, um zu überprüfen, ob diese Matrilin-4 tatsächlich spalten können. In einem zweiten Ansatz sollte versucht werden, die Matrilin-4 Prozessierung zu blockieren, indem Matrilin-4 exprimierende Zellen mit für alle Klassen von Proteasen spezifischen Inhibitoren inkubiert wurden.

##### **3.4.1 *In silico* Analyse zur Identifikation potentieller Matrilin-4-spaltender Proteasen**

In einer Recherche in der Internet-Proteasedatenbank MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) wurde anhand der Matrilin-4 Prozessierungsstelle nach Proteasen gesucht, für die Substrate bekannt sind, die C-terminal von Glutamatresten proteolytisch gespalten werden.

Die Suche ergab acht Proteasen aus Vertebraten, die C-terminal eines Glutamatrestes spalten können. Eine davon, Cathepsin D, gehört zur Klasse der lysosomalen Aspartatproteasen, bei sechs weiteren handelte es sich um Metalloproteasen, sowie

die Tubulin-Tyr Carboxypeptidase, die bis jetzt keiner Klasse zugeordnet werden konnte und in verschiedenen Tubulin  $\alpha$ -Ketten spaltet.

**Tab. 3.2: Ergebnisse der MEROPS-Proteasedatenbanksuche nach Proteasen aus Vertebraten, die C-terminal von zwei Glutamatresten spalten können.** Aufgelistet sind Bezeichnung und MEROPS-Identitätsnummer der Protease, Substrate, bei denen eine Spaltung hinter Glutamatresten nachgewiesen wurde, und die Aminosäuresequenz der entsprechenden Spaltstelle.

Protease	MEROPS ID	Spaltstelle	Substrat
Cathepsin D	A01.009	... <sup>6</sup> E↓K...	Hämoglobin $\beta$ -Kette
MMP-3 (Stromelysin-1)	M10.005	... <sup>143</sup> E↓L...	Plasminogen-Aktivator
MMP-7 (Matrylisin)	M10.008	... <sup>143</sup> E↓L...	Plasminogen Aktivator
Najalysin	M12.167	... <sup>282</sup> E↓D...	platelet glycoprotein GPIIb-V-XII Komplex $\alpha$ -Kette
Mocarhagin	M12.173	... <sup>282</sup> E↓D...	platelet glycoprotein GPIIb-V-XII Komplex $\alpha$ -Kette
ADAMTS-4	M12.221	... <sup>1667</sup> E↓G...	Aggrecan core protein
Dipeptidyl-Peptidase III	M49.001	EE↓EE	EEEE (synthetisches Peptid)
Tubulin-Tyr Carboxypeptidase	U9E.002	... <sup>450</sup> E↓Y...	Tubulin $\alpha$ 1-Kette
		... <sup>449</sup> E↓Y...	Tubulin $\alpha$ 2-Kette
		... <sup>448</sup> E↓Y...	Tubulin $\alpha$ 6-Kette
		... <sup>448</sup> E↓F...	Tubulin $\alpha$ 8-Kette

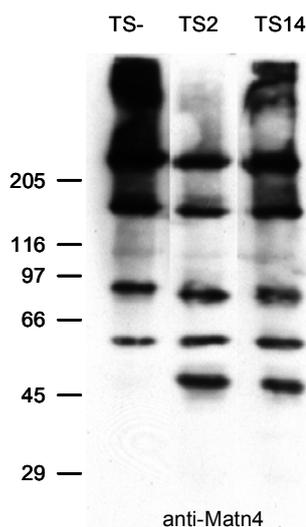
Zu den identifizierten Metalloproteasen gehörten die Matrix Metalloproteasen (MMPs) MMP-3 und MMP-7. MMP-3 spaltet unter anderem Proteoglykane und Kollagen-Propeptide (s. Sternlicht & Werb, 2001). Weiterhin wurden drei Mitglieder der Familie der Astacine (auch Adamalysine genannt) identifiziert: ADAMTS-4, Najalysin und Mocarhagin. ADAMTS-4 ist eine sezernierte Metalloprotease, die Aggrecan und andere Proteoglykane spaltet und möglicherweise in der Pathogenese von Osteoarthritis involviert ist (Malfait *et al.*, 2002). Najalysin und Mocarhagin sind Metalloproteasen aus Schlangengiften und daher für die Matrilin-4 Spaltung physiologisch nicht relevant. Zusätzlich wurde noch die Metalloprotease Dipeptidyl-Peptidase III als möglicher Kandidat identifiziert.

### 3.4.2 Koexpression und -inkubation von Matrilin-4 mit verschiedenen Proteasen

Bei der *in silico* Recherche wurden einige potentielle Kandidaten identifiziert, die zur Familie der MMPs gehören, oder mit den ADAMs verwandt sind. Deshalb wurde zunächst für ADAMTS-2, ADAMTS-4 und ADAMTS-14 getestet, ob sie Matrilin-4 spalten können. Da keines der Enzyme in unserem Institut vorhanden war, wurden die Experimente in Zusammenarbeit mit verschiedenen Kooperationspartnern durchgeführt.

ADAMTS-4 wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Horst Will (Invitex, Berlin) getestet. Dazu wurde affinitätsgereinigtes Matrilin-4 mit dem Enzym verdaut und das Bandenmuster nach SDS-PAGE untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass ADAMTS-4 Matrilin-4 nicht spaltet (nicht gezeigt).

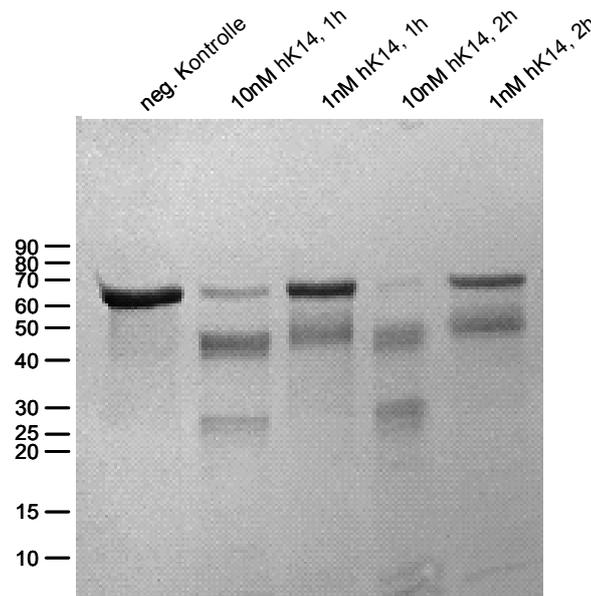
Die Enzyme ADAMTS-2 und -14 wurden durch Koexpression von rekombinantem Matrilin-4 und den rekombinanten Proteasen in 293EBNA Zellen untersucht. Zellen, die stabil mit einem ADAMTS-2- oder -14-Konstrukt bzw. dem leeren Vektor pCEP4 als Negativkontrolle (Colige *et al.*, 2002) transfiziert worden waren, wurden von Dr. Alain Colige (Universität Lüttich, Belgien) zur Verfügung gestellt und mit dem Volllänge Konstrukt von Matrilin-4 im Vektor pCEP-Pu C-strep transfiziert. Die Zellen wurden mit den Antibiotika Hygromycin B und Puromycin selektiert und das Fragmentierungsmuster von Matrilin-4 in den Überständen im Immunoblot untersucht.



**Abb. 3.13: Koexpression von Matrilin-4 mit ADAMTS-2 (TS2) oder ADAMTS-14 (TS14) in 293EBNA Zellen.** Proteine der konditionierten Überstände wurden auf einem 4-12% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und Matrilin-4 mit affinitätsgereinigten Antikörpern detektiert. Negativkontrolle (TS-): Mit Matrilin-4 und leerem Vektor pCEP4 kotransfizierte Zellen.

Nach einer Koexpression von Matrilin-4 mit ADAMTS-2 oder ADAMTS-14 waren die Fragmentierungsmuster von Matrilin-4 im Vergleich zum Muster der Negativkontrolle verändert (s. Abb. 3.13). Die Mengenverhältnisse der Trimere und prozessierten Di- und Monomere veränderten sich zwar nicht signifikant, allerdings trat eine zusätzliche Matrilin-4 immunreaktive Proteinbande bei ca. 50 kDa auf, die bei der Negativkontrolle fehlte. Das deutete darauf hin, dass ADAMTS-2 und ADAMTS-14 Matrilin-4 spalten können, jedoch nicht an der proteolytischen Prozessierung in der C-terminalen Scharnierregion beteiligt sind. Daher wurde diese mögliche Spaltung nicht weiter untersucht.

In einem *phage-display screen* mit der humanen Protease Kallikrein-14 (hK14) wurde ein Peptid als Substrat für die Protease identifiziert, dessen Sequenz „VGSLR“ der Aminosäuresequenz von Position 177-182 in der VWA1-Domäne von humanem Matrilin-4 entspricht (Felber *et al.*, 2005). In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, ob auch rekombinantes murines Matrilin-4 von hK14 gespalten werden kann. Dazu wurde affinitätsgereinigtes, C-terminal StreptII-markiertes Matrilin-4 mit dem Enzym inkubiert und die Fragmentierungsmuster im SDS-PAGE nach Reduktion der Proteine untersucht.



**Abb. 3.14: Inkubation von affinitätsgereinigtem Matrilin-4 mit Kallikrein-14 (hK14).** Matrilin-4 wurde für 1 oder 2h mit 1 oder 10nM hK14 inkubiert, die Proteine reduziert, auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie-blau gefärbt. Das Experiment wurde von Loyse Felber im Labor von Dr. David Deperthes (Epalinges, Schweiz) durchgeführt.

Matrilin-4 hatte nach Reduktion ein apparentes Molekulargewicht von ca. 65 kDa (s. Abb. 3.14). Nach Inkubation mit hK14 wurde diese Bande deutlich schwächer, dafür erschienen zwei neue Banden bei 17,5 und 48 kDa. Dieser Effekt wurde durch längere Inkubation und Erhöhung der hK14 Konzentration verstärkt. Aufgrund der beobachteten Molekulargewichte der Spaltprodukte und der identifizierten Schnittstelle im Matrilin-4 Peptid ist es wahrscheinlich, dass diese Spaltung in der VWA1 Domäne stattfindet. In diesem Fall würde die 17,5 kDa Bande das N-terminale und die 48 kDa Bande das C-terminale Spaltprodukt repräsentieren. Allerdings wäre eine exakte Bestimmung der Schnittstelle durch N-terminale Sequenzierung der Spaltprodukte für eine sichere Zuordnung der Banden unerlässlich. Weiterhin ist eine physiologische Bedeutung dieser Spaltung fraglich, da die Proteolyse von Matrilin-4 nur in

Anwesenheit von 500 mM Tris bei pH 7,5 beobachtet werden konnte. In einem Kontrollexperiment, war humanes Kallikrein-8 allerdings nicht in der Lage, Matrilin-4 zu spalten (nicht gezeigt), so dass die Matrilin-4 Spaltung von hK-14 spezifisch zu sein scheint. Diese Experimente wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. David Deperthes (Epalinges, Schweiz) von Loyse Felber durchgeführt.

Die Ergebnisse deuteten darauf hin, das die untersuchten Proteasen ADAMTS-2, ADAMTS-14 und Kallikrein-14 *in vitro* dazu in der Lage sind, Matrilin-4 proteolytisch zu spalten. Keine dieser Proteasen schien jedoch für die proteolytische Prozessierung in der C-terminalen Scharnierregion der Matrilin verantwortlich zu sein. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass es Proteasen aus den Familien der Adamalysine und Kallikreine gibt, die Matrilin-4 an anderen Stellen, möglicherweise innerhalb der VWA-Domänen, proteolytisch spalten können.

### **3.4.3 Inhibitionsexperiment Matrilin-4 exprimierender Zellen**

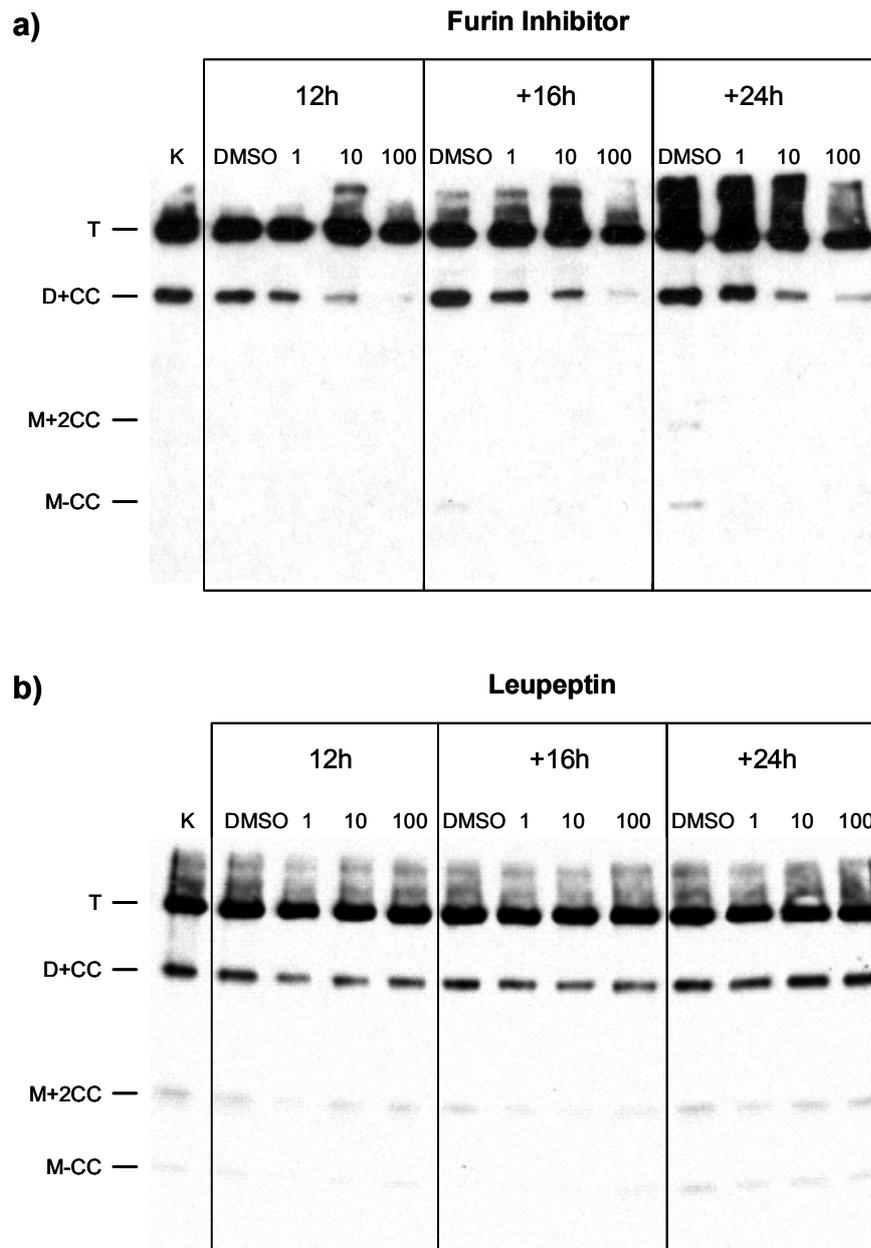
In einem zweiten experimentellen Ansatz wurde versucht, die proteolytische Prozessierung von Matrilin-4 zu blockieren und so die möglicherweise involvierten Proteasen zu identifizieren. Dazu wurden Matrilin-4 exprimierende 293EBNA Zellen in Anwesenheit verschiedener Proteaseinhibitoren kultiviert und die Fragmentierungsmuster von Matrilin-4 in den konditionierten Überständen durch SDS-PAGE und Immunoblot untersucht. Alle Inhibitoren wurden in drei unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt, die jeweils um den Faktor 10 voneinander variierten. Die Zellen wurden zunächst 24h in serumfreiem Medium kultiviert, um Serumproteine vollständig zu entfernen. Anschließend wurden sie für 12h in Anwesenheit der Inhibitoren oder der entsprechenden Lösungsmittel zur Negativkontrolle inkubiert, die Überstände geerntet, für weitere 16h in neuem Medium mit frisch zugesetzten Inhibitoren kultiviert, die Überstände erneut geerntet und der Vorgang für zusätzliche 24h wiederholt. Als Inhibitoren gegen Metalloproteasen wurden 1,10-ortho-Phenanthrolin, Amastatin-HCl und, als Inhibitor von MMPs, GM6001 eingesetzt. Zur Inhibition von Serinproteasen wurden AEBSF und Aprotinin verwendet. Als Inhibitor einiger Serin und Cysteinproteasen wurde Leupeptin angewendet, mit E-64 und dessen membranpermeabler Version E-64d wurden Cysteinproteasen im Allgemeinen inhibiert. Pepstatin A wurde zur Inhibition von Aspartatproteasen eingesetzt, und die Aktivität von Proproteinkonvertasen wie Furin mit dem spezifischen Inhibitor Decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-Chloromethylketon inhibiert. Eine Übersicht über die verwendeten Inhibitoren bietet Tabelle 3.3, die entsprechenden Literaturangaben und weitere Angaben zu den Inhibitoren sind in Abschnitt 2.3.5 und Tabelle 2.2 zu finden.

**Tab. 3.3: Übersicht über die verwendeten Proteaseinhibitoren, eingesetzte Konzentrationen und von ihnen inhibierte Proteasen.**

<b>Inhibitor</b>	<b>inhibierte Proteasen</b>	<b>eingesetzte Konz.</b>
1,10-o-Phenanthrolin	Metallo	10; 100; 1000 $\mu$ M
Amastatin	Metallo	1; 10; 100 $\mu$ M
GM 6001	MMPs	0,1; 1; 10; 30 $\mu$ M
AEBSF	Serin	20; 200; 2000 $\mu$ M
Aprotinin	Serin	0,1; 1; 10 $\mu$ g/ml
Leupeptin	Serin, Cystein	1; 10; 100 $\mu$ M
E-64	Cystein	0,1; 1; 10 $\mu$ M
E-64d	Cystein	0,1; 1; 10 $\mu$ M
Pepstatin A	Aspartat	0,1; 1; 10 $\mu$ M
Furin-Inhibitor	Furin	1; 10; 100 $\mu$ M

Die Analyse der Fragmentierungsmuster von Matrilin-4 in den gesammelten Überständen ergab, dass ausschließlich der spezifische Furin-Inhibitor in der Lage war, die proteolytische Prozessierung von Matrilin-4 zu blockieren. Bereits bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M war die Menge prozessierter Matrilin-4 Fragmente bei allen untersuchten Zeitpunkten verringert (s. Abb. 3.15a). Der Effekt nahm mit steigender Konzentration des Inhibitors deutlich zu, bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M wurde die Prozessierung nahezu vollständig blockiert.

Im Gegensatz dazu blieben die Matrilin-4 Prozessierungsmuster durch Inkubation der Zellen mit den anderen Inhibitoren unbeeinflusst (siehe exemplarisch Abb. 3.15b für Leupeptin). 1,10-o-Phenanthrolin und AEBSF waren in den jeweils beiden höchsten Konzentration (0,1 und 1 mM bzw. 0,2 und 2 mM) bei längerer Inkubation als 12 Stunden cytotoxisch, hatten jedoch in niedrigeren Konzentrationen und bei der kürzesten Inkubationsdauer keinen Effekt. Die Ergebnisse konnten in zwei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert werden.



**Abb. 3.15: Einfluss von Inhibitoren auf die proteolytische Prozessierung von Matrilin-4.** Überstände von Matrilin-4 exprimierenden 293EBNA Zellen, die in Anwesenheit eines Furin-Inhibitors (a) oder Leupeptin (b) inkubiert wurden, wurden auf 7% SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, die Proteine auf Nitrozellulose transferiert und die Matrilin-4 Fragmentierungsmuster mit spezifischen Antikörpern detektiert. Die Inhibitoren wurden in Konzentrationen von jeweils 1, 10 oder 100  $\mu\text{M}$  eingesetzt und die Zellen für 12, weitere 16 und weitere 24h in serumfreiem Medium mit den entsprechenden Inhibitoren kultiviert. Als Negativkontrolle wurde den Medien DMSO (1% v/v) beigefügt. K=Kontrolle ohne Zusatz von DMSO.

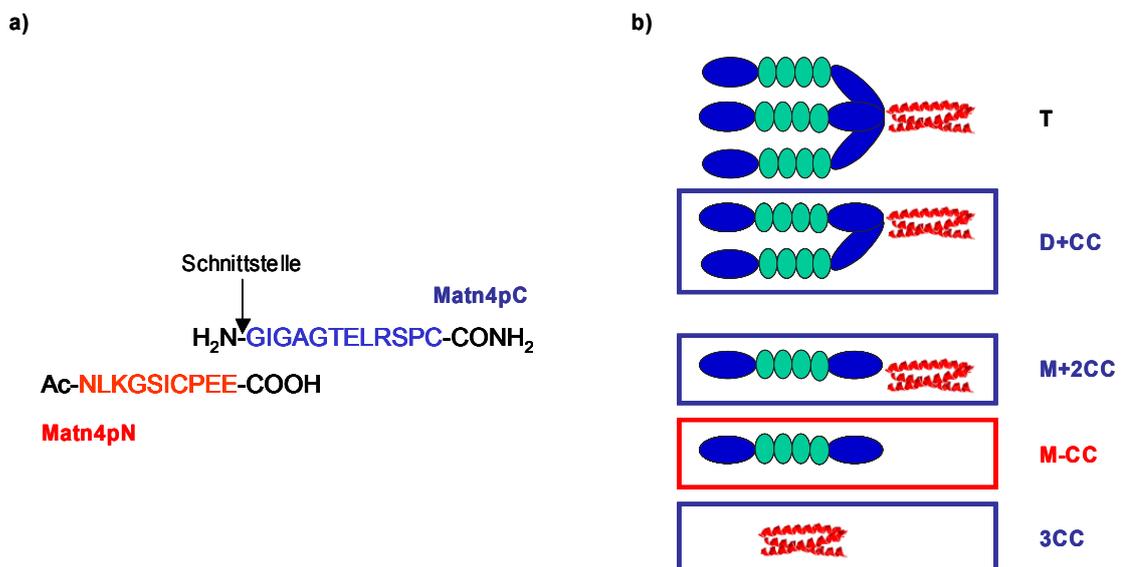
Ebenfalls ohne Effekt war die Inkubation der Zellen mit SB431542 (nicht gezeigt), einem spezifischen Inhibitor der *transforming growth factor*- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)-Rezeptorkinasen ALK-4, -5 und -7 (Massague *et al.*, 2000, Laping *et al.*, 2002).

### 3.5 Gewebespezifische Prozessierung von Matrilin-4

Die proteolytische Prozessierung von Matrilin-4 in Geweben sollte durch die Detektion prozessierter Matrilin-4-Fragmente mit Schnittstellen-spezifischen Neo-Epitop Antikörpern in Extrakten, Überständen primärer Zellkulturen und auf histologischen Schnitten untersucht werden.

#### 3.5.1 Herstellung und Auswahl Schnittstellen-spezifischer Neo-Epitop Antikörper

Zur Herstellung Schnittstellen-spezifischer Antikörper, die entweder gegen die C- oder N-terminal durch die Prozessierung entstehenden Matrilin-4 Neo-Epitope gerichtet sein sollten, wurden Peptide synthetisiert, deren Sequenz entweder aus den ersten (N-terminalen) zwölf Aminosäureresten des C-terminalen Prozessierungsproduktes (GIGAGTELRSPC, Matn4pC) oder aus den letzten (C-terminalen) zehn Aminosäureresten des N-terminalen Prozessierungsproduktes (NLKGSICPEE, Matn4pN), bestand (s. Abb. 3.16a). Ein Antikörper gegen das Peptid Matn4pC sollte also die prozessierten Fragmente mit trimerer *coiled-coil* Domäne (D+CC, M+2CC, 3CC), ein anti-Matn4pN Antikörper das abgeschnittene Monomer (M-CC), spezifisch erkennen (s. Abb. 3.16b).



**Abb. 3.16: Herstellung Schnittstellen-spezifischer Neo-Epitop Antikörper zur Detektion prozessierter Matrilin-4 Fragmente.** a) Sequenz der Peptide Matn4pC (blau) und Matn4pN (rot). b) Schematische Darstellung von Matrilin-4 und seiner Prozessierungsprodukte. Prozessierte Fragmente mit trimerer *coiled-coil* Domäne (blau eingerahmt) sollen von Antikörpern gegen das Peptid Matn4pC, abgeschnittene Monomere ohne *coiled-coil* Domäne (rot eingerahmt) von anti-Matn4pN Antikörpern, erkannt werden.

Beide Peptide wurden von der Firma Pineda Antikörper Service (Berlin) synthetisiert und jeweils zwei Kaninchen und zwei Meerschweinchen mit einem der Peptide immunisiert. Die Antiseren wurden anschließend im Immunoblot getestet. Dazu wurden Matrilin-4-haltige Zellkulturüberstände und EDTA-Extrakte von Maushirnen auf SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und die Membranen mit den verschiedenen Antiseren, den entsprechenden Präimmunseren oder affinitätsgereinigten Antikörpern gegen Matrilin-4 inkubiert.

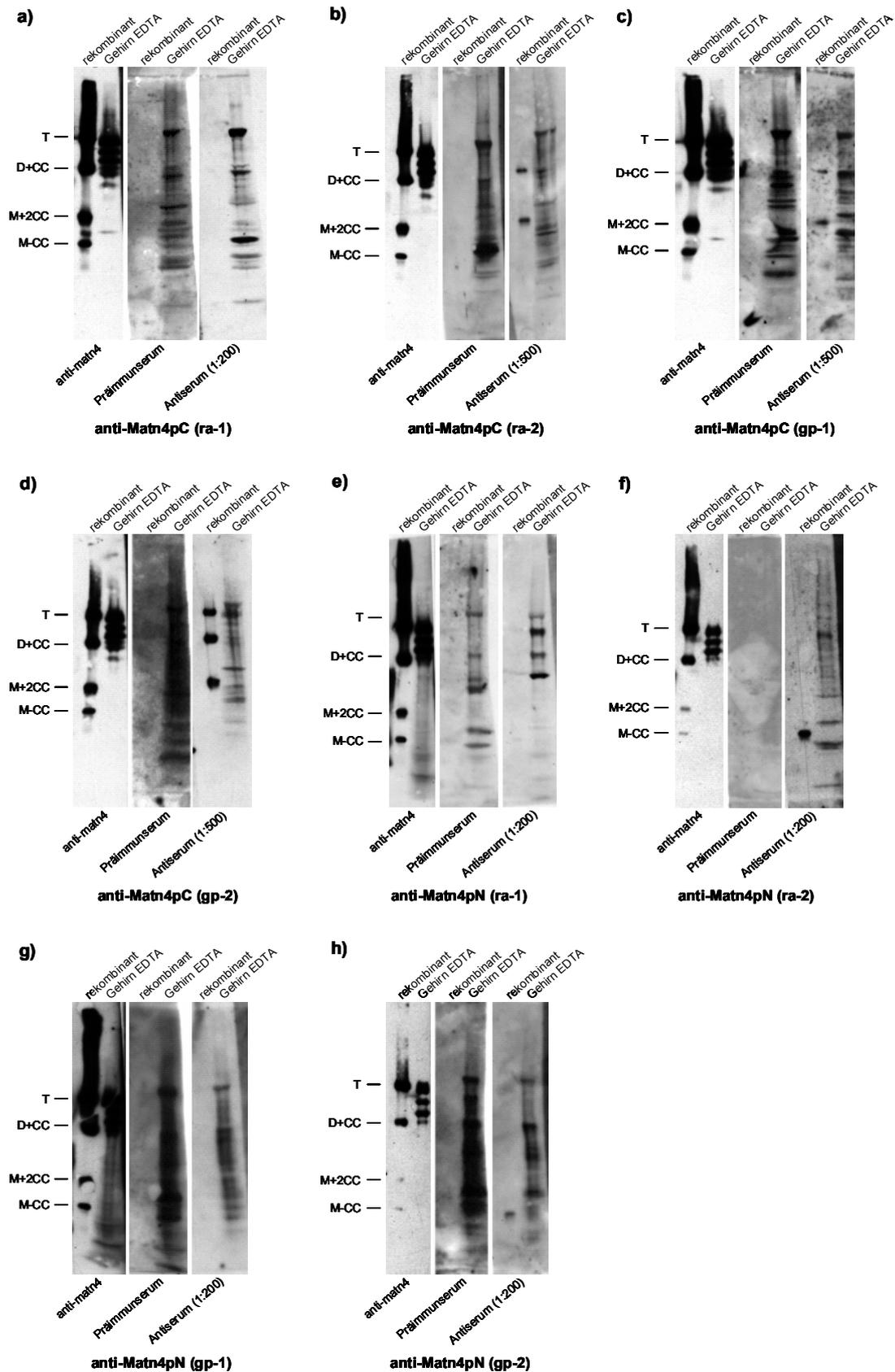
Alle Antiseren und die entsprechenden Präimmunseren besaßen eine starke Kreuzreaktivität mit Proteinen aus Gehirnextrakten. Das Antiserum eines mit dem Peptid Matn4pC immunisierten Kaninchens (*rabbit* Tier-1, ra-1), sowie die Seren eines mit Matn4pN immunisierten Kaninchens (ra-1) und eines Meerschweinchens (*guinea pig* Tier-1, gp-1), zeigten keine Reaktivität gegenüber rekombinantem Matrilin-4 (s. Abb. 3.17a, e und g) und waren also unbrauchbar. Keines der Präimmunseren reagierte mit rekombinant exprimiertem Matrilin-4.

Die anti-Matn4pC Antiseren der Tiere ra-2, gp-1 und gp-2 erkannten spezifisch rekombinante prozessierte Di- (D+CC) und Monomere (M+2CC), ohne abgeschnittene Monomere (M-CC) zu detektieren. Das anti-Matn4pC gp-2 Antiserum kreuzreagierte jedoch zusätzlich mit dem unprozessierten Trimer (s. Abb. 3.17b-d).

Das rekombinante abgeschnittene Monomer (M-CC) wurde von den anti-Matn4pN Antiseren der Tiere ra-2 und gp-2 spezifisch erkannt, wobei das Serum des Tiers gp-2 schwach mit unprozessiertem Trimer kreuzreagierte (s. Abb. 3.17f und h).

Es konnten also zwei Antiseren generiert werden, die spezifisch und ausschließlich prozessierte Di- und Monomere von rekombinantem Matrilin-4 erkannten, und eines, mit dem sich spezifisch abgeschnittenes Monomer nachweisen ließ. Aufgrund der starken Hintergrundsignale auf Gewebeextrakten wurden die Antiseren anti-Matn4pC (ra-2) und anti-Matn4pN (ra-2) mittels der jeweiligen an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelten Peptide affinitätsgereinigt.

Nach der Affinitätsreinigung zeigte der Antikörper gegen das N-terminale Neo-Epitop (anti-Matn4pN ra-2) eine starke Kreuzreaktivität gegen das unprozessierte Trimer (nicht gezeigt) und wurde daher nicht weiter verwendet. Die Charakterisierung des affinitätsgereinigten anti-Matn4pC (ra-2) Antikörpers wird im folgenden Abschnitt 3.5.2 näher beschrieben.

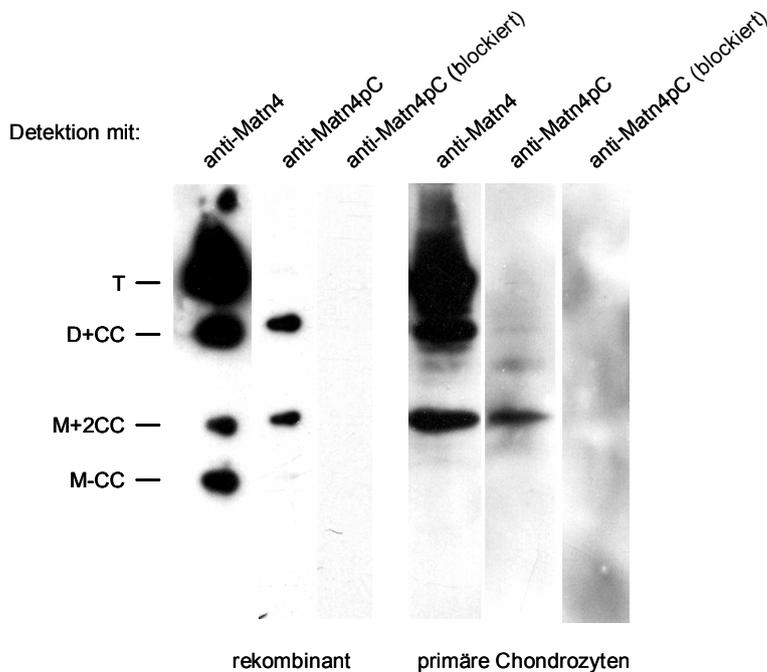


**Abb. 3.17: Test der Matrilin-4 Neo-Epitop Antiseren im Immunoblot.** Konditionierte Überstände Matrilin-4 rekombinant exprimierender 293EBNA Zellen (rekombinant) und EDTA-Extrakt aus Maushirn (Gehirn EDTA) wurden auf 4-12% SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert.

Anschließend wurden die Immunoblots mit affinitätsgereinigtem anti-Matn4 Antikörper, Antiseren der mit dem Peptid Matn4pC (a-d) bzw. Matn4pN (e-h) immunisierten Kaninchen (ra) oder Meerschweinchen (gp), oder den entsprechenden Präimmunseren (Verdünnung 1:100) inkubiert.

### 3.5.2 Prozessierung von Matrilin-4 in Primärkulturen muriner Chondrozyten

Um die affinitätsgereinigten Neo-Epitop Antikörper anti-Matn4pC (ra-2)<sup>2</sup> zu charakterisieren und die Prozessierung von Matrilin-4 *in vivo* zu untersuchen, wurden konditionierte Überstände transfizierter 293EBNA Zellen und nicht-transfizierter Primärkulturen muriner Chondrozyten durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und prozessiertes Matrilin-4 im Immunoblot mit dem anti-Matn4pC Antikörper detektiert. Zur Überprüfung der Spezifität des Antikörpers wurde ein Aliquot von anti-Matn4pC mit dem zur Immunisierung verwendeten Peptid Matn4pC vorinkubiert und ebenfalls zur Detektion im Immunoblot eingesetzt.



**Abb. 3.18: Nachweis prozessierter Matrilin-4 Fragmente mit affinitätsgereinigtem Neo-Epitop Antikörper.** Konditionierte Überstände von rekombinant Matrilin-4 exprimierenden 293EBNA Zellen oder nicht-transfizierten primären murinen Chondrozyten wurden auf einem 4-15% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die Detektion erfolgte mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen Matrilin-4, das Peptid Matn4pC, oder mit anti-Matn4pC Antikörpern, die durch Vorinkubation mit dem Peptid blockiert worden waren.

Die affinitätsgereinigten Antikörper gegen das C-terminale Neo-Epitop (Matn4pC) erkannten spezifisch prozessierte Di- und Monomere von rekombinant exprimiertem Matrilin-4 (s. Abb. 3.18). Ein Vergleich der relativen Mengen prozessierter Matrilin-4

<sup>2</sup> Zur Vereinfachung wird im Folgenden bei der Bezeichnung des anti-Matn4pC (ra-2) Antikörpers auf den Zusatz „ra-2“ verzichtet, da die Antiseren anderer Tiere in dieser Arbeit keine weitere Verwendung fanden.

Fragmente zeigte aber, dass die Neo-Epitop Antikörper das prozessierte Monomer proportional stärker als das prozessierte Dimer detektierten. Dies war darauf zurückzuführen, dass beim Monomer durch die Prozessierung zwei Neo-Epitope entstehen, beim Dimer nur eins. Eine Vorinkubation mit dem zur Immunisierung verwendeten Peptid Matn4pC führte zu einem vollständigen Verlust dieser Signale.

In Überständen primärer muriner Chondrozytenkulturen waren mit den anti-Matn4 Antikörpern Proteinbanden nachweisbar, die Trimer und prozessierte Di- und Monomere repräsentieren. Abgeschnittene Monomerfragmente fehlten jedoch. Die Neo-Epitop Antikörper reagierten spezifisch mit der Bande auf Höhe des prozessierten Monomers, das prozessierte Dimer wurde nur sehr schwach erkannt. Auch hier führte eine Vorinkubation mit dem Peptid zu einem Verlust der Signale. In Überständen primärer Chondrozyten zeigte der spezifische Nachweis der Matrilin-4 Neo-Epitope, die durch proteolytische Prozessierung C-terminal der konservierten Glutamatreste frei geworden waren, dass die in 293EBNA Zellen beobachtete Prozessierung des rekombinanten Proteins auch *in vivo* stattfindet.

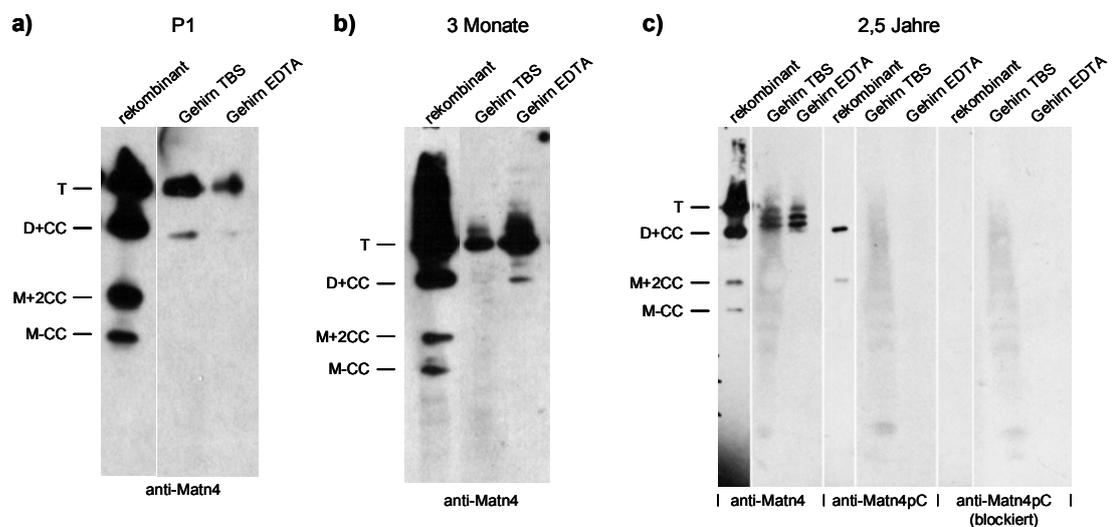
#### **3.5.3 Untersuchung der heterogenen Matrilin-4 Bandenmuster in Gewebeertrakten mit den Neo-Epitop Antikörpern**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Matrilin-4 in Primärkulturen muriner Chondrozyten proteolytisch prozessiert wird, sollten die heterogenen Bandenmuster von Matrilin-4 in TBS- und EDTA-Extrakten muriner Gewebe untersucht werden. Dazu wurden zunächst Extrakte aus Gehirnen von Mäusen unterschiedlicher Altersstufen hergestellt und im Immunoblot mit Antikörpern gegen Matrilin-4 und Matn4pC untersucht.

Wie bereits für Gelenkknorpel beschrieben, zeigte ein Vergleich der Matrilin-4 Fragmentierungsmuster in TBS- und EDTA Extrakten aus Gehirnen neugeborener, drei Monate und 2,5 Jahre alter Mäuse, dass die Heterogenität des Matrilin-4 Fragmentierungsmusters mit steigendem Alter zunimmt (s. Abb. 3.19). Im Gehirn neugeborener und drei Monate alter Mäuse kam Matrilin-4 vornehmlich als Trimer vor. Bei der neugeborenen Maus war ein weiteres Matrilin-4 Fragment und bei der drei Monate alten Maus waren zwei weitere Fragmente in geringer Menge vorhanden. Im Gegensatz dazu war Matrilin-4 im Gehirn einer 2,5 Jahre alten Maus hauptsächlich in Form zweier Fragmente zu finden, die im SDS-PAGE zwischen Trimer und prozessiertem Dimer des rekombinanten Proteins liefen. Unfragmentierte Trimere waren zwar vorhanden, jedoch verhältnismäßig schwer detektierbar. Ein weiteres

Fragment, das im SDS-PAGE unterhalb dieser drei Matrilin-4 Banden lief, war nur sehr schwach nachweisbar.

In keinem dieser Fragmente konnte das durch proteolytische Prozessierung entstandene Matrilin-4 Neo-Epitop nachgewiesen werden (s. Abb. 3.19c am Beispiel der Gehirnextrikte aus 2,5 Jahre alten Mäusen). Zwar wurden durch die Affinitätsreinigung die zuvor beobachteten Kreuzreaktivitäten des ungereinigten Antiserums mit anderen extrahierten Proteinen entfernt (vgl. Abb. 3.17b), proteolytisch prozessierte Oligomere wurden jedoch nur bei rekombinantem Matrilin-4 detektiert.

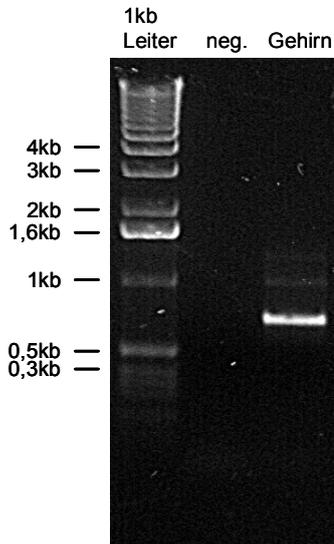


**Abb. 3.19: Fragmentierungsmuster von Matrilin-4 in Gehirnexttrakten von Mäusen unterschiedlicher Altersstufen.** Sequentielle TBS (Gehirn TBS) und EDTA-Extrakte (Gehirn EDTA) neugeborener (a), 3 Monate (b) und 2,5 Jahre alter (c) Mäuse, sowie konditionierte Überstände Matrilin-4 exprimierender 293EBNA Zellen (rekombinant), wurden auf 4-15% SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und die Proteine auf Nitrozellulose transferiert. Die Detektion erfolgte mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen Matrilin-4, gegen das Peptid Matn4pC, oder mit dem anti-Matn4pC Antikörper, der durch Vorinkubation mit dem Peptid blockiert worden war, gegen das immunisiert wurde.

Matrilin-4 in Gehirnexttrakten wurde also entweder an anderer Position prozessiert, oder prozessierte Fragmente waren nur in so geringen Mengen vorhanden, dass sie unter der Nachweisgrenze des anti-Matn4pC Peptid-Antikörpers lagen. Die gleiche Beobachtung wurde für Extrakte aus Calvaria, Lunge, Rippenknorpel, Gelenkknorpel und Wirbelsäule gemacht, in denen ebenfalls mit den Neo-Epitop Antikörpern keine prozessierten Matrilin-4 Fragmente nachgewiesen werden konnten (nicht gezeigt).

Ein weiterer Mechanismus, der zum heterogenen Erscheinungsbild von Matrilin-4 im Gewebe beitragen kann, ist alternatives Spleißen der mRNA. Um zu untersuchen, welche Matrilin-4 Spleißvarianten in Gehirnen alter Mäuse synthetisiert werden, wurde

mRNA aus dem Gehirn einer 2,5 Jahre alten Maus extrahiert, Matrilin-4 Transkripte durch RT-PCR amplifiziert und auf einem Agarosegel aufgetrennt.



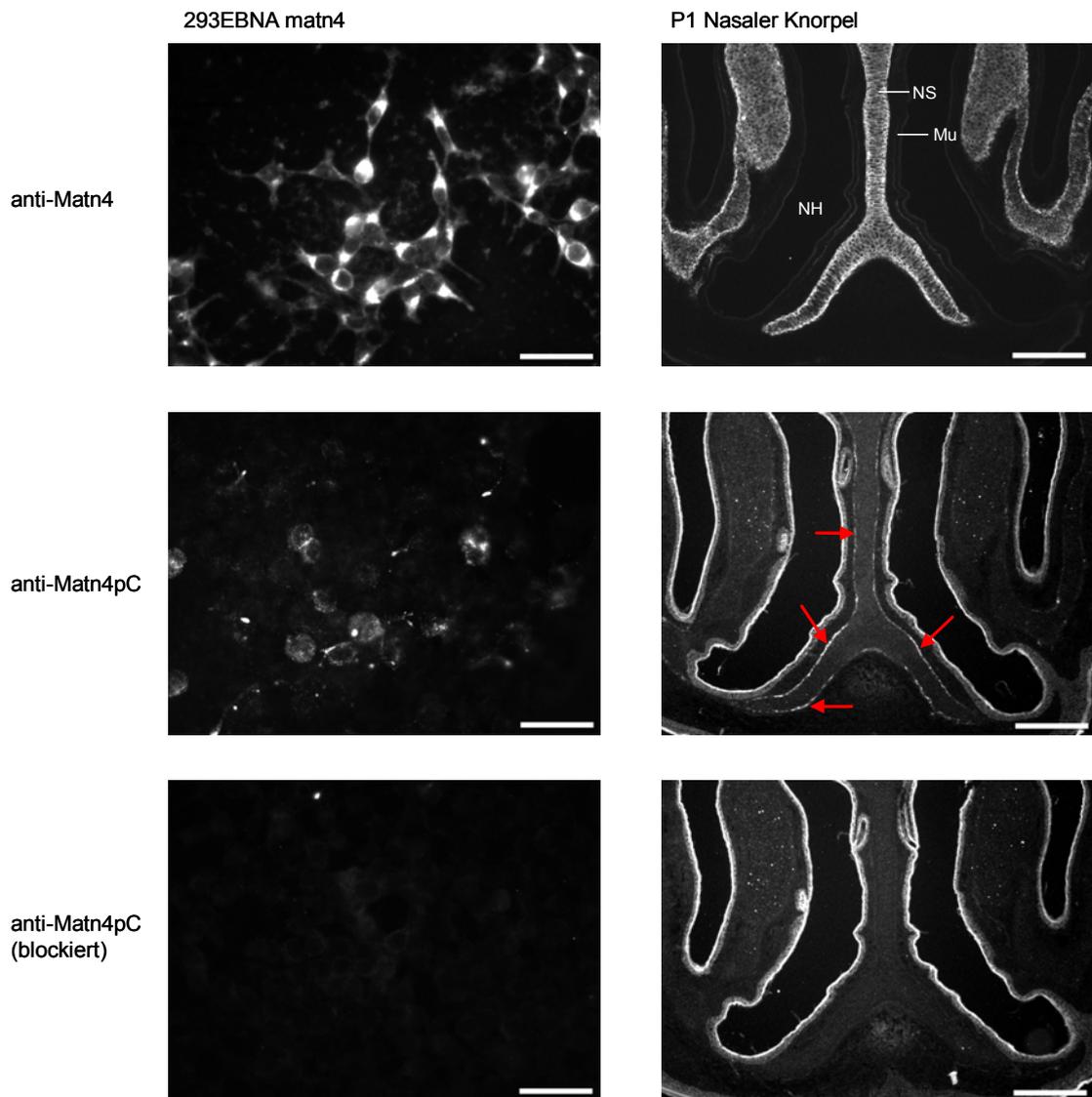
**Abb. 3.20: Alternatives Spleißen von Matrilin-4 mRNA im Gehirn einer 2,5 Jahre alten Maus.** Die mRNA wurde aus dem Gehirn einer 2,5 Jahre alten Maus isoliert, in cDNA revers transkribiert, Matrilin-4 Transkripte durch PCR amplifiziert und auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt. neg.: PCR mit Wasser als Vorlage.

Es konnten drei DNA-Fragmente von ca. 700, 1000 und 1300 bp Länge amplifiziert werden, wobei das 700 bp Fragment in quantitativ größter Menge vorhanden war (s. Abb. 3.20). Durch Sequenzierung der PCR-Produkte wurde gezeigt, dass es sich bei dem 700 bp Fragment um eine alternative Spleißvariante (Wagener *et al.*, 1998a) handelte, in der die Nukleotide 179-738 der cDNA-Sequenz, entsprechend der Sequenz der VWA1-Domäne des Proteins, fehlten. Die Sequenz des 1,3 kb Fragments entsprach der mRNA, der diese 570 Nukleotide nicht fehlen. Das 1 kb Fragment stellte die Heteroduplex DNA dar.

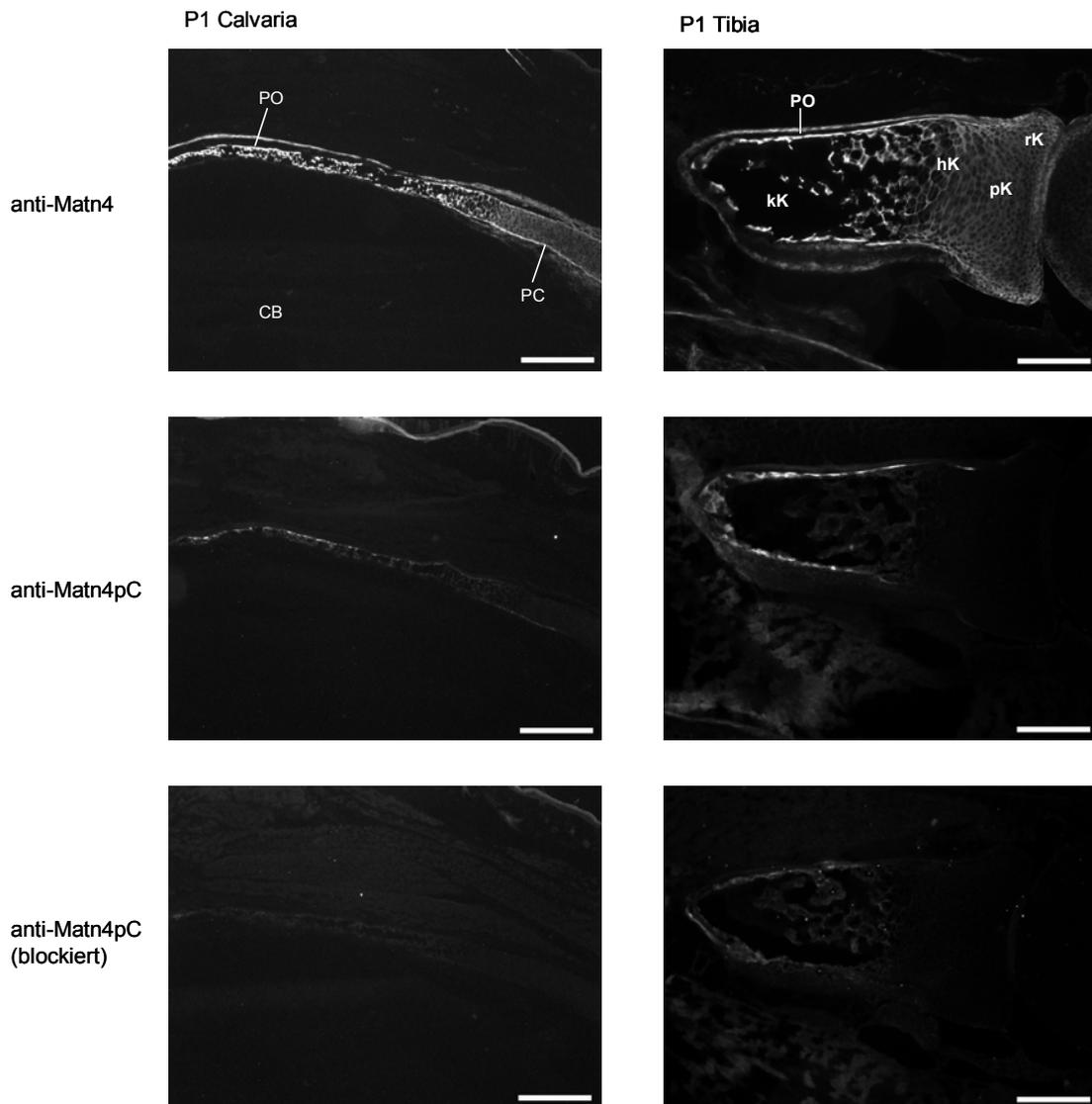
Die zwei Matrilin-4 Proteinfragmente, die in Gehirnextrakten von 2,5 Jahre alten Mäusen in der SDS-PAGE zwischen Trimer und prozessiertem Dimer der Positivkontrolle liefen, bestanden daher wahrscheinlich aus Heterooligomeren der Translationsprodukte unterschiedlich gespleißter Matrilin-4 Transkripte, denen teilweise die VWA1 Domäne fehlte.

#### 3.5.4 Gewebespezifische Prozessierung von Matrilin-4

In Immunoblots von Gewebeextrakten konnten mit den Neo-Epitop Antikörpern keine prozessierten Matrilin-4 Fragmente nachgewiesen werden. Aufgrund der höheren Sensitivität in der Immunfluoreszenz sollte prozessiertes Matrilin-4 in Gefrierschnitten neugeborener Mäuse lokalisiert werden.



**Abb. 3.21: Immunfluoreszenzfärbung von transfizierten 293EBNA Zellen und nasalem Knorpel neugeborener Mäuse.** Zum Nachweis wurden affinitätsgereinigte Antikörper gegen Matrilin-4 (anti-Matn4) oder die durch Prozessierung entstandenen Matrilin-4 Neo-Epitope (anti-Matn4pC) eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde Peptid-blockierter anti-Matn4pC Antikörper verwendet. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte durch nachfolgende Inkubation mit einem Alexa488<sup>TM</sup>-konjugierten anti-Kaninchen IgG Antikörper. Die Balken entsprechen 50 µm (293EBNA matn4, linke Spalte) bzw. 200 µm (nasaler Knorpel, rechte Spalte). NH=Nasenhohlraum, NS=Nasenscheidewand, Mu=Mukosa.



**Abb. 3.22: Immunfluoreszenzfärbung von Calvaria und Tibia neugeborener Mäuse.** Zum Nachweis wurden affinitätsgereinigte Antikörper gegen Matrilin-4 (anti-Matn4) oder die durch Prozessierung entstandenen Matrilin-4 Neo-Epitope (anti-Matn4pC) eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde Peptidblockierter anti-Matn4pC Antikörper verwendet. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte durch nachfolgende Inkubation mit einem Alexa488<sup>TM</sup>-konjugierten anti-Kaninchen IgG Antikörper. Die Balken entsprechen 400µm (Calvaria, links) bzw. 200µm (Tibia, rechts). CB=Cerebellum, PC=Perichondrium, PO=Periosteum, rK=ruhender Knorpel, pK=proliferierender Knorpel, hK=hypertropher Knorpel, kK=kalzifizierter Knorpel.

Zunächst wurden die affinitätsgereinigten Neo-Epitop Antikörper durch Immunfluoreszenzdetektion auf Matrilin-4 exprimierenden 293EBNA Zellen getestet. Diese Zellen bildeten keine Matrilin-4-haltigen extrazellulären Netzwerke, wegen der Überexpression war neu synthetisiertes Matrilin-4 hingegen intrazellulär nachweisbar (s. Abb. 3.21, linke Spalte). Auch prozessiertes Matrilin-4 konnte mit affinitätsgereinigten anti-Matn4pC Neo-Epitop Antikörpern schwach nachgewiesen

werden. Eine Vorinkubation der Antikörper mit dem Peptid Matn4pC führte zu einem Verlust dieser Signale.

Auf Gefrierschnitten neugeborener Mäuse war prozessiertes Matrilin-4 ausschließlich in Perichondrium des Knorpels der Nasenscheidewand und Periosteum bereits verknöchertes Bereiche von Calvaria, Tibia (s. Abb. 3.21, rechte Spalte und Abb. 3.22) und weiterer skeletaler Gewebe wie Wirbelkörper, Rippen und Zehenknochen (nicht gezeigt) nachweisbar. In anderen Geweben, in denen Matrilin-4 exprimiert wird, konnten keine spezifischen Signale mit den Neo-Epitop Antikörpern detektiert werden. Immunfluoreszenzdetektion prozessierter Matrilin-4 Fragmente in Mausembryonen 15,5 Tage *post coitum*, zeigte sehr schwache Signale in Perichondrien einzelner Wirbelkörper und von Knorpelanlagen einiger Rippen (nicht gezeigt).

## 4 Diskussion

Rekombinantes Matrilin-4 wird in der Scharnierregion, C-terminal von zwei in allen Matrilinen konservierten Glutamatresten proteolytisch gespalten (Klatt *et al.*, 2001). Durch diese Prozessierung werden einzelne Arme des trimeren Moleküls abgeschnitten, so dass dimere und monomere Varianten von Matrilin-4 entstehen, die weiterhin eine vollständig assemblierte, trimere *coiled-coil* Oligomerisierungsdomäne besitzen. Die massenspektrometrische Analyse der Fragmentierung von rekombinanten Matrilin-3 ergab, dass dieses Protein ebenfalls in der C-terminalen Scharnierregion prozessiert wird (Klatt, Dissertation, 2001). Eine exakte Bestimmung der Proteaseschnittstelle war allerdings nicht möglich, da das rekombinante Matrilin-3 N-terminal markiert war und somit die C-terminalen Prozessierungsprodukte durch die Affinitätsreinigung nicht angereichert und nachfolgend sequenziert werden konnten. Für Matrilin-2 wurde gezeigt, dass mono-, di-, tri- und tetramere Formen, sowie zahlreiche kleinere Fragmente des Proteins existieren (Piecha *et al.*, 1999). Ob diese durch proteolytische Prozessierung in der C-terminalen Scharnierregion, unvollständige Assemblierung der *coiled-coil* Domänen oder einen anderen Mechanismus entstehen, war jedoch unbekannt. Eine potentielle proteolytische Prozessierung von Matrilin-1, welches nur in sehr geringem Maße fragmentiert wird (Klatt, Dissertation, 2001), wurde bislang ebenfalls nicht untersucht.

### 4.1 Proteolytische Prozessierung der Matriline im Gewebe und nach rekombinanter Expression

#### 4.1.1 Proteolytische Prozessierung rekombinanter Matriline

Die proteolytische Prozessierung von Matrilin-4 war vor dieser Arbeit hauptsächlich an rekombinanten, C-terminal StrepII-markiertem Protein untersucht worden, das in 293EBNA Zellen exprimiert worden war (Klatt *et al.*, 2001). Dieses Expressionssystem hatte sich hinsichtlich der Ausbildung posttranslationaler Modifikationen und der Proteinausbeute in unserer Arbeitsgruppe bewährt. Zur Charakterisierung einer möglichen Prozessierung der anderen Matriline wurden Matrilin-1, -2 und -3 Volllänge cDNA Konstrukte erstellt, wie Matrilin-4 in den Expressionsvektor pCEP-Pu C-strep kloniert und in 293EBNA Zellen transfiziert.

In Immunoblots der konditionierten Überstände besaßen alle rekombinant exprimierten Matriline ähnliche Fragmentierungsmuster (s. Abb. 3.1). Rekombinantes Matrilin-1

zeigte Banden mit apparenten Molekulargewichten, die näherungsweise den theoretischen Molekulargewichten von Trimer (T), prozessiertem Dimer (D+CC) und prozessierten Monomeren (M+2CC und M-CC) entsprachen. Bei rekombinantem Matrilin-2 waren potentiell prozessiertes Di- und Monomer, sowie abgespaltenes Monomer nachweisbar (s. Abb. 3.1 und 3.4b). Die Auflösung der SDS-Polyacrylamidgele ließ keine Aussage darüber zu, ob es sich bei der obersten Matrilin-2 Bande um ein Tetramer oder ein potentiell prozessiertes Trimer handelt. Auch für rekombinantes Matrilin-3 und -4 waren erwartungsgemäß alle möglichen prozessierten oligomeren Formen von Mono- bis Tetramer bzw. Trimer zu finden (s. Abb. 3.1 und 3.2).

Da bei Matrilin-1 und -2 jeweils Banden zu erkennen waren, die wahrscheinlich abgeschnittene Monomere ohne *coiled-coil* Domäne repräsentieren, ist anzunehmen, dass die Fragmentierung von Matrilin-1 und -2 auf einer proteolytischen Prozessierung im C-terminalen Bereich beruht. Diese Prozessierung findet wahrscheinlich wie bei Matrilin-3 und -4 (Klatt, Dissertation, 2001; Klatt *et al.*, 2001) in der Scharnierregion zwischen VWA2 Domäne und *coiled-coil* Domäne statt.

C-terminal StreptII-markiertes Matrilin-2 und Matrilin-3 zeigten dabei gleiche Prozessierungsmuster wie Matrilin-2 ohne Markierung (Piecha *et al.*, 1999), bzw. Matrilin-3 mit N-terminaler His<sub>6</sub>-Markierung (Klatt, Dissertation, 2001) oder ohne Markierung (Klatt *et al.*, 2000), so dass ein Einfluss der Markierungen auf Oligomerisierung und Prozessierung ausgeschlossen werden konnte.

#### 4.1.2 Das heterogene Erscheinungsbild der Matriline im Gewebe

Der Vergleich der Prozessierungsmuster der rekombinanten Proteine mit den heterogenen Fragmentierungsmustern von Matrilinen in Gewebeextrakten zeigte, dass alle endogenen Matriline ähnlich prozessiert werden, wie die rekombinanten Proteine (s. Abb. 3.1, 3.2, 3.3 und 3.19). Den Hauptanteil bilden dabei jeweils die unprozessierten Oligomere, bzw. in einigen Fällen bei Matrilin-4 ein oder zwei Fragmente, die zwar kleiner als das Trimer, aber größer als das prozessierte Dimer sind. Daher entstehen sie wahrscheinlich nicht durch Prozessierung in der C-terminalen Scharnierregion (s. Abb. 3.2 und 3.19). Sowohl rekombinantes als auch aus Gewebe extrahiertes Matrilin-1 wird in deutlich geringerem Ausmaß als die anderen Matriline prozessiert, wobei Matrilin-2 tendenziell das größte Ausmaß an Prozessierung zeigt.

Analoge Fragmentierungsmuster waren von Matrilin-1 und -3 bereits in humanen Gelenkknorpel- und murinen Calvariaextrakten, von Matrilin-2 in Extrakten muriner Gewebe wie Uterus, Haut und Calvaria und in Überständen mehrerer Matrilin-2

exprimierender Zelllinien sowie von Matrilin-4 in murinen Calvaria- und Gehirnextrakten beobachtet worden (Piecha *et al.*, 1999; Klatt *et al.*, 2001; Klatt, Dissertation, 2001). In Uterus und Haut konnten dabei weitere Prozessierungs- oder Degradationsprodukte von Matrilin-2 mit apparenten Molekulargewichten von unter 100 kDa (Piecha *et al.*, 1999), nachgewiesen werden, deren Entstehung nicht allein durch eine proteolytische Prozessierung in der C-terminalen Scharnierregion erklärt werden kann. Eine ähnliche Fragmentierung zeigte auch rekombinantes, C-terminal StrepII-markiertes Matrilin-2 nach Detektion mit Matrilin-2-spezifischen Antikörpern (s. Abb. 3.4b) sowie rekombinantes Matrilin-2 ohne Markierung (Piecha *et al.*, 1999). Auch von Matrilin-3 existieren im Gewebe Fragmente, die jeweils etwas größer oder kleiner als die potentiell prozessierten Trimere und Dimere sind (s. Abb. 3.1 und 3.3). Die Existenz dieser zusätzlichen Matrilinfragmente deutet darauf hin, dass die Heterogenität der Matriline im Gewebe noch von weiteren Faktoren beeinflusst werden kann. Bei Matrilin-3 könnte es sich dabei teilweise um Matrilin-1/-3 Heterooligomere handeln, die unter anderem bei Menschen und Mäusen nachgewiesen wurden (Kleemann-Fischer *et al.*, 2001; Klatt, Dissertation, 2001). Möglicherweise wurde die Heterogenität der Matrilin-3 Fragmente in humanem arthrotischen Gelenkknorpel (s. Abb. 3.3) zusätzlich krankheitsbedingt erweitert, da degenerative Knorpelerkrankungen wie Osteoarthritis oft mit einer verstärkten Expression und erhöhten Aktivität extrazellulärer Proteasen einhergehen (zur Übersicht s. Martel-Pelletier *et al.*, 2001). Auch Matrilin-3 wird in arthrotischem Knorpel verstärkt exprimiert und prozessiert (Pullig *et al.*, 2002).

#### **4.1.3 Altersbedingte Veränderungen der Heterogenität von Matrilin-4**

In Extrakten aus Calvaria, Wirbelsäule, Rippenknorpel, Gelenkknorpel und Lunge von einem Jahr alten Mäusen ist Matrilin-4 stark fragmentiert, während das Erscheinungsbild von Matrilin-4 im Gelenkknorpel neugeborener Mäuse weniger heterogen ist (s. Abb. 3.2). Auch im Gehirn ändert sich das Fragmentierungsmuster von Matrilin-4 mit zunehmendem Alter der Mäuse (s. Abb. 3.19). Während in Gehirnextrakten neugeborener Mäuse ausschließlich Banden auf Höhe des Trimers und des prozessierten Dimers detektiert werden können, ist bei drei Monate alten Mäusen eine weitere Bande zwischen Trimer und Dimer zu erkennen. Bei 2,5 Jahre alten Mäusen machen zwei Fragmente mit apparenten Molekulargewichten zwischen denen des Trimers und des prozessierten Dimers den Hauptanteil von Matrilin-4 im Gehirn aus.

Eine RT-PCR zeigte (s. Abb. 3.20), dass Matrilin-4 im Gehirn 2,5 Jahre alter Mäuse vornehmlich in Form einer alternativen Spleißvariante exprimiert wird, der die VWA1 Domäne fehlt (Wagener *et al.*, 1998a). Auch das längere Transkript ist in geringer

Menge vorhanden (s. Abb. 3.20). Die Spleißvariante von Matrilin-4 ohne VWA1 Domäne wurde bislang in Lunge, Sternum, Gehirn, Niere und Herz sieben Wochen alter Mäuse nachgewiesen, konnte jedoch nicht in Mäusen identifiziert werden, die jünger als drei Wochen waren (Wagener *et al.*, 1998a). Eine zeitgleiche Expression beider alternativ gespleißter Matrilin-4 Transkripte könnte dazu führen, dass sich Matrilin-4 Trimere aus Untereinheiten mit und ohne VWA1 Domäne zusammenlagern. Bei den beiden Matrilin-4 Proteinfragmenten im Gehirn von 2,5 Jahre alten Mäusen, die kleiner als das Trimer, aber größer als das prozessierte Dimer sind, könnte es sich folglich um zwei unterschiedliche „Hetero“-Trimere handeln, bei denen entweder nur eine oder zwei Untereinheiten eine VWA1 Domäne besitzen. Demnach wäre das heterogene Erscheinungsbild von Matrilin-4 im Gewebe nicht nur auf proteolytische Prozessierung in der C-terminalen Scharnierregion, sondern auch auf ein möglicherweise altersabhängiges alternatives Spleißen der mRNA zurückzuführen.

## 4.2 Charakterisierung potentieller Prozessierungsstellen in der C-terminalen Scharnierregion der Matriline

### 4.2.1 Prozessierung rekombinanter Matriline mit mutiertem „EE“-Motiv

Die Tatsache, dass Matrilin-4 C-terminal zweier Glutamatreste in der Scharnierregion gespalten wird, die in allen Matrilinen konserviert sind, ließ vermuten, dass es sich dabei um eine konservierte Protease-Erkennungssequenz handelt. Um dies näher zu untersuchen, wurden im Vorfeld dieser Arbeit Konstrukte von Matrilin-1, -2, -3 und -4 erstellt, bei denen das konservierte „EE“-Motiv durch *in vitro* Mutagenese gegen zwei Alanin- oder Glutaminreste ausgetauscht worden war (Ehlen, Diplomarbeit, 2002). Die mutierten Proteine wurden wie die wildtypischen Matriline als rekombinante Fusionsproteine mit dem BM40 Signalpeptid und C-terminaler StrepII-Markierung in 293EBNA Zellen exprimiert.

Eine erste Analyse der Prozessierungsmuster der mutierten Matrilin-4 Proteine hatte ergeben, dass das konservierte „EE“-Motiv bei Matrilin-4 tatsächlich als Protease-Erkennungssequenz fungiert (Ehlen, Diplomarbeit, 2002). Der Austausch der Glutamatreste gegen zwei Alanin- oder Glutaminreste reduziert das Ausmaß der Prozessierung von Matrilin-4 signifikant, führt jedoch nicht zu einem vollständigen Verlust der Spaltung (s. Abb. 3.4d). Die massenspektrometrische Analyse der Prozessierungsprodukte ergab, dass die Massen der prozessierten *coiled-coil* Domänen der mutierten Proteine mit der Masse des entsprechenden

Prozessierungsprodukts von wildtypischem Matrilin-4 übereinstimmen (Ehlen, Diplomarbeit, 2002). Die proteolytische Prozessierung findet also auch nach Mutagenese der Spaltstelle an gleicher Position in der Scharnierregion statt, wie bei wildtypischem Matrilin-4. Da die Mutation zu Alanin oder Glutamin keinen Unterschied machte, wurde bei der Herstellung der mutierten Matrilin-1, -2 und -3 Konstrukte die jeweils technisch einfacher einzuführende Mutation gewählt.

Im Immunoblot von mutiertem, rekombinantem Matrilin-1 (M1AA) sind prozessierte Di- und Monomere nicht mehr nachweisbar (s. Abb. 3.4a). Dies zeigt, dass die Matrilin-1 Fragmente beim wildtypischen Protein (M1) durch eine proteolytische Prozessierung in der C-terminalen Scharnierregion entstehen, und dass die konservierten Glutamatreste auch bei Matrilin-1 eine Erkennungssequenz für Proteasen darstellen. Matrilin-1 wird in deutlich geringerem Ausmaß prozessiert als die anderen Matriline. Es ist daher offen, ob die Spaltstelle durch die Mutation vollständig ausgeschaltet wird, oder ob wie bei Matrilin-4 weiterhin eine geringfügige Menge von Prozessierungsprodukten entsteht, die allerdings unter der Nachweisgrenze liegt.

Die Mutation des „EE“-Motivs in der C-terminalen Scharnierregion von Matrilin-2 hat, verglichen mit dem Wildtyp, keinen Einfluss auf die Mengenverhältnisse prozessierter Mono-, Di- und Trimere (s. Abb. 3.4b). Dafür ist jedoch die Heterogenität des Fragmentierungsmusters unterhalb 100 kDa bei mutiertem Matrilin-2 deutlich reduziert. Einige dieser Proteinbanden sind nach Mutagenese der Glutamatreste nicht mehr nachweisbar. Folglich dient das konservierte „EE“-Motiv auch bei Matrilin-2 als Proteaseschnittstelle.

Da das mutierte Protein weiterhin stark prozessiert wird, existieren wahrscheinlich zusätzliche Schnittstellen im C-terminalen Bereich. Massenspektrometrische Untersuchungen verkürzter Matrilin-2 Proteine deuteten darauf hin, dass sich diese Schnittstellen in der *unique* Sequenz befinden können (F. Deák, persönliche Mitteilung). Dabei handelt es sich um eine Sequenz von 75 Aminosäureresten, die keine Homologien zu Domänen anderer Proteine besitzt und in der zwei weitere Glutamatreste vorkommen, die als alternative Schnittstelle dienen könnten. Außerdem sind 19 Aminosäurereste, die auch ein ungepaartes Cystein enthalten, auf einem Exon kodiert, das alternativ gespleißt wird. Die alternative Spleißvariante ohne dieses Exon wurde in Mensch, Maus und Ratte gefunden (Deák *et al.*, 1997; Piecha *et al.*, 1999; Muratoglu *et al.*, 2000). In den meisten untersuchten Zelllinien wurden beide Spleißvarianten in ungefähr gleicher Menge nachgewiesen, was bedeuten könnte, dass sich Matrilin-2 Oligomere aus beiden Spleißvarianten bilden. In ersten Versuchen

mit den beiden rekombinant hergestellten Spleißvarianten bildet die Variante ohne den ungepaarten Cysteinrest Trimere (F. Deák, persönliche Mitteilung), wie die Matrilin-2 *coiled-coil* Domäne alleine (Frank *et al.*, 2002). Der ungepaarte Cysteinrest könnte an der Bildung eines Disulfid-verknüpften Hexamers aus zwei Matrilin-2 Trimeren beteiligt sein (F. Deák, persönliche Mitteilung). Die beobachteten Matrilin-2 Tetramere (Piecha *et al.*, 1999) könnten demnach durch proteolytische Abspaltung zweier Arme eines Hexamers entstanden sein. Dieses Modell muss jedoch durch weitere Experimente bestätigt werden. Da die in dieser Arbeit verwendeten Matrilin-2 Konstrukte der längeren Spleißvariante mit dem ungepaarten Cysteinrest in der *unique* Sequenz entsprechen, könnte deren Heterogenität durch zusätzliche intermolekulare Disulfidbrücken artifiziell erweitert worden sein, da alle Arme des Oligomers diesen ungepaarten Cysteinrest enthalten.

Bei Matrilin-3 wird das Prozessierungsmuster durch die Mutation des „EE“-Motivs nicht beeinflusst. Das mutierte Protein M3QQ wird in gleichem Ausmaß prozessiert, wie das wildtypische Protein M3 (s. Abb. 3.4c und 3.5). Die massenspektrometrische Untersuchung und N-terminale Sequenzierung der proteolytisch prozessierten *coiled-coil* Domänen in reduziertem Zustand ergab, dass in der Matrilin-3 Scharnierregion mehrere, bei wildtypischem und mutiertem Matrilin-3 identische Proteaseschnittstellen vorhanden sind (s. Abb. 3.6 und 3.7). Die Spaltung erfolgt einerseits C-terminal der konservierten Glutamatreste, bzw. ausgetauschten Glutaminreste ( $^{429}\text{EE}\downarrow\text{ARSLISIEDA}$  bzw.  $^{429}\text{QQ}\downarrow\text{ARSLISIEDA}$ ), findet jedoch bei einem Teil beider Proteine zwei Aminosäurereste weiter C-terminal statt ( $^{431}\text{AR}\downarrow\text{SLISIEDA}$ ). Im Massenspektrum von wildtypischem Matrilin-3 kann ein drittes Fragment identifiziert werden, das vier Aminosäurereste C-terminal des „EE“-Motivs gespalten wird ( $^{433}\text{SL}\downarrow\text{ISIEDA}$ ).

#### 4.2.2 Einfluss struktureller Elemente der Matriline auf die Prozessierung

Vergleicht man das Ausmaß, in dem die einzelnen Matriline proteolytisch prozessiert werden, so ist eine Abhängigkeit von der Länge ihrer Scharnierregion möglich. Matrilin-1, dessen Scharnierregion nur aus dem Tetrapeptid „EEDP“ besteht, wird nur wenig prozessiert. Matrilin-2, dessen Scharnierregion zusammen mit der *unique* Sequenz 80 Aminosäurereste umfasst, wird am stärksten prozessiert (s. Abb. 3.4).

Ein Austausch der Matrilin-4 Scharnierregion „GIGAGTELRSP“ gegen die kurze Matrilin-1 Scharnierregion „DP“ führt jedoch nur zu einer schwachen Verringerung der Prozessierung, wobei die zusätzliche Mutation des „EE“-Motivs diesen Effekt deutlich verstärkt (s. Abb. 3.8). Die Länge der Scharnierregion beeinflusst ihre Anfälligkeit für proteolytische Spaltungen also nur geringfügig. Die Ergebnisse deuten vielmehr darauf

hin, dass die Matrilin-1 Scharnierregion in Matrilin-4 stärker prozessiert wird, als in Matrilin-1 selbst. Daher scheinen andere strukturelle Merkmale der Matriline einen größeren Einfluss auf die proteolytische Prozessierung zu haben, als die Länge der Scharnierregion.

Die rekombinanten Matrilin-4 Proteine mit unterschiedlich langen Scharnierregionen wurden ohne die N-terminale VWA1 Domäne exprimiert. Das Protein mit unveränderter Scharnierregion entspricht somit der kürzeren Spleißvariante von murinem Matrilin-4 (Wagener *et al.*, 1998a). Diese Variante von Matrilin-4 wird in 293EBNA Zellen in vergleichbarem Ausmaß prozessiert wie das rekombinante Matrilin-4 mit VWA1 Domäne (s. Abb. 3.2 und 3.8). Ein Verlust der VWA1 Domäne hat also bei Matrilin-4 keinen Einfluss auf die Prozessierung.

Eine besondere Rolle könnte dagegen den VWA2 Domänen zukommen. Bei Matrilin-3, dem die VWA2 Domäne grundsätzlich fehlt, hat die Mutation der „EE“-Schnittstelle keinen Einfluss auf das Ausmaß der Prozessierung. Außerdem sind nur bei Matrilin-3 nachweisbare Mengen von Prozessierungsprodukten vorhanden, die in unmittelbarer Nähe der Glutamatreste gespalten werden. Möglicherweise ist die Matrilin-3 Scharnierregion aufgrund der fehlenden VWA2 Domäne besser für Proteasen zugänglich als die Scharnierregionen der anderen Matriline.

Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass eine rekombinante Deletionsmutante von Matrilin-1, der die VWA2 Domäne fehlt, Mono-, Di- und Trimere bildet, während das vollständige Protein und eine Deletionsmutante, der die VWA1 Domäne fehlt, in der entsprechenden Studie ausschließlich in trimerer Form nachgewiesen werden konnten (Chen *et al.*, 1999). Die Autoren diskutieren daher einen möglichen Einfluss der VWA2 Domäne auf die Oligomerisierungseigenschaften der *coiled-coil* Domäne. Allerdings zeigten neuere Untersuchungen, dass rekombinante *coiled-coil* Domänen von Matrilin-1 alleine äußerst stabile Trimere bilden (Frank *et al.*, 2002). Da die Scharnierregion und das konservierte „EE“-Motiv in der Sequenz der VWA2 Deletionsmutante vollständig enthalten sind (Chen *et al.*, 1999), entstehen die Mono- und Dimere wahrscheinlich durch proteolytische Prozessierung in der Scharnierregion. Vollständige Matrilin-1 Proteine werden hingegen gar nicht oder nur geringfügig prozessiert, da ihre VWA2 Domäne die Prozessierung vermutlich sterisch behindert. Der Verlust der VWA1 Domäne hat weder bei Matrilin-1 (Chen *et al.*, 1999) noch bei Matrilin-4 (s. Abb. 3.8) einen Einfluss auf das Ausmaß der Prozessierung.

In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass die Affinitätsreinigung rekombinant exprimierter, monomerer Matriline ohne *coiled-coil* Domänen scheiterte, da wahrscheinlich die C-terminalen StrepII-Markierungen proteolytisch abgespalten

werden (G. Sengle, persönliche Mitteilung). Das könnte darauf hindeuten, dass die *coiled-coil* Domänen ebenfalls keinen Einfluss auf die Prozessierung haben. Das Problem bei der Affinitätsreinigung konnte dadurch gelöst werden, dass bei einer erneuten Klonierung der Proteine auf die konservierten Glutamatreste verzichtet wurde.

Die VWA2 Domäne von Matrilin-4 scheint die Zugänglichkeit der Scharnierregion für Proteasen nicht so stark zu behindern wie die VWA2 Domäne von Matrilin-1. Dies zeigt sich darin, dass erstens, wildtypisches Matrilin-4 in ähnlichem Ausmaß prozessiert wird wie Matrilin-3, das keine VWA2 Domäne besitzt; zweitens, die Matrilin-1 Scharnierregion in dem chimären Matrilin-4 Protein stärker prozessiert wird, als in wildtypischem Matrilin-1; und drittens, die Mutagenese der konservierten Schnittstelle bei Matrilin-1 zu einem Verlust der Spaltung führt, während mutiertes Matrilin-4 an gleicher Position weiterhin schwach prozessiert wird. Im Gegensatz zu Matrilin-3 konnten bislang jedoch keine Prozessierungsprodukte von Matrilin-4 nachgewiesen werden, die an alternativen Schnittstellen in der Scharnierregion prozessiert werden. Möglicherweise führen sterische Einflüsse der Matrilin-4 VWA2 Domäne dazu, dass nur die spezifischere „EE“-Schnittstelle genutzt werden kann, während die Matrilin-1 VWA2 Domäne die Prozessierungsstelle sterisch nahezu vollständig blockiert und das Fehlen einer VWA2 Domäne bei Matrilin-3 die Prozessierung an zusätzlichen, unspezifischeren Schnittstellen nahe des „EE“-Motivs erlaubt. Das würde auch erklären, warum die Mutation des „EE“-Motivs die Prozessierung von Matrilin-4 stark einschränkt, bei Matrilin-3 jedoch keinen Effekt zeigt.

Bei Matrilin-2 wie bei Matrilin-1 führt die Mutagenese des „EE“-Motivs in der Scharnierregion zu einer vollständigen Eliminierung der konservierten Spaltstelle (s. Abb. 3.4). Das könnte bedeuten, dass auch die Matrilin-2 Scharnierregion ähnlich unzugänglich ist wie die von Matrilin-1. Da wahrscheinlich zusätzliche Spaltstellen in der *unique* Sequenz von Matrilin-2 existieren (F. Deák, persönliche Mitteilung), hat der Verlust einer Spaltstelle nur einen geringen Einfluss auf das Gesamtausmaß der Prozessierung. Das könnte darauf hindeuten, dass die *unique* Sequenz von Matrilin-2 exponierter und damit für Proteasen angreifbarer ist, als die Scharnierregion. Welche Spaltstelle generell bevorzugt wird, bzw. im Gewebe genutzt wird, wurde noch nicht untersucht.

Die Scharnierregionen der Matriline stellen also kurze, für Proteasen angreifbare Sequenzen dar, in denen die Proteolyse vornehmlich C-terminal der konservierten

Glutamatreste stattfindet. Die Anwesenheit dieser Reste begünstigt zwar eine Spaltung, ist jedoch keine unbedingte Voraussetzung für eine Prozessierung. Ausmaß und Spezifität der Prozessierung werden von der Zugänglichkeit der Scharnierregion bestimmt, die wahrscheinlich von der räumlichen Anordnung der benachbarten VWA2 Domäne und zu einem geringen Teil von der Länge der Scharnierregion abhängig ist.

### **4.3 Untersuchungen zum Mechanismus der proteolytischen Prozessierung von Matrilin-4**

#### **4.3.1 Lokalisation der Prozessierung**

In verschiedenen Experimenten wurde untersucht, ob die proteolytische Prozessierung von Matrilin-4 im extra- oder perizellulären Milieu, oder intrazellulär während des Transports in Kompartimenten des sekretorischen Transportweges stattfindet. Die Experimente wurden dabei in der Regel mit rekombinantem, C-terminal StrepII-markiertem Matrilin-4 oder stabil transfizierten 293EBNA Zellen durchgeführt, die dieses Protein exprimieren.

Erste Indizien für eine peri- oder intrazelluläre Lokalisation der proteolytischen Prozessierung von Matrilin-4 wurden bereits im Vorfeld dieser Arbeit in einem *pulse-chase* Experiment gewonnen (Ehlen, Diplomarbeit, 2002). Die Analyse der Sekretionskinetik von radioaktiv markiertem Matrilin-4 zeigt, dass prozessierte Fragmente bereits sehr früh nach der Sekretion im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden können (s. Abb. 3.10). Außerdem bleiben die Mengenverhältnisse von prozessiertem zu unprozessiertem Matrilin-4 über 24 Stunden konstant. Matrilin-4 wird also in diesem Zeitraum nicht mehr im Zellkulturüberstand prozessiert. Ebenso führt eine längere Inkubation zellfreier, Matrilin-3- oder Matrilin-4-haltiger Zellkulturüberstände von bis zu acht bzw. sieben Tagen zu keiner weiteren Prozessierung (s. Ab. 3.9). Matrilin-3 und -4 werden also nicht von Proteasen im Zellkulturüberstand prozessiert. Intrazelluläres Matrilin-4, das aus Lysaten transfizierter 293EBNA Zellen affinitätsgereinigt wurde, zeigt das gleiche Prozessierungsmuster wie Matrilin-4 aus konditionierten Überständen (s. Abb. 3.11). Demzufolge wird Matrilin-4 in 293EBNA Zellen bereits intrazellulär prozessiert. Das Risiko einer Verfälschung der Ergebnisse durch perizellulär assoziiertes Matrilin-4 wurde durch ausgiebigen Trypsinverdau der Zellen vor der Lyse minimiert. Nach subzellulärer Fraktionierung Matrilin-4 überexprimierender Zellen sind prozessierte Dimere in nahezu allen

Fraktionen vorhanden, unter anderem in solchen, die zwar endoplasmatisches Retikulum, aber keine Golgi-Marker enthalten (s. Abb. 3.12).

Daher handelt es sich bei der proteolytischen Prozessierung in der C-terminalen Scharnierregion von Matrilin-4 um eine posttranslationale Modifikation, die bereits vor der Sekretion in Kompartimenten des sekretorischen Transportweges abläuft und möglicherweise bereits im endoplasmatischen Retikulum stattfinden kann.

### 4.3.2 Proteasen, die Matrilin-4 spalten können

Recherchen in der Proteasedatenbank MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) ergaben, dass zum Zeitpunkt dieser Arbeit nur wenige Proteasen in Vertebraten bekannt waren, die C-terminal von Glutamatresten spalten können (s. Tab. 3.2). Die meisten dieser Enzyme gehören zur Metzincin Oberfamilie von Metalloproteasen, darunter zwei MMPs und ADAMTS-4. Dabei handelt es sich zwar um sezernierte Proteasen, die Proteine der extrazellulären Matrix proteolytisch spalten können (zur Übersicht s. Sternlicht & Werb, 2001), jedoch konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass mehrere dieser Enzyme auch intrazellulär vorkommen und aktiv sein können. So wurde zum Beispiel für MMP-1 gezeigt, dass diese eigentlich als extrazelluläre Kollagenase bekannte Protease (Lovejoy *et al.*, 1999) an intrazelluläre Kompartimente wie Mitochondrien und Zellkerne assoziiert sein kann (Limb *et al.*, 2005). Auch wenn bislang unbekannt ist, wie MMP-1 dorthin transportiert wird, scheint die Protease eine anti-apoptotische Funktion auszuüben, indem sie verhindert, dass das Kernmembranprotein Lamin A/C durch Caspasen degradiert wird (Limb *et al.*, 2005). Eine andere, teilweise intrazellulär aktive Protease ist die Transmembranprotease MT1-MMP, die wahrscheinlich entlang des Tubulin Cytoskeletts in Endosomen zu den Centrosomen transportiert wird und dort centrosomale Proteine spaltet (Golubkov *et al.*, 2005). Aufgrund der Ergebnisse dieser und anderer Studien ist anzunehmen, dass viele extrazelluläre Proteasen auch intrazelluläre Funktionen besitzen können. Außerdem werden viele sezernierte Proteasen bereits während des Transportes aktiviert. Daher wurden bei der Suche nach Proteasen, die Matrilin-4 spalten, auch sezernierte Enzyme berücksichtigt, obwohl gezeigt wurde, dass die proteolytische Prozessierung intrazellulär stattfindet.

Ein bei der Datenbankrecherche ermittelter, potentiell Matrilin-4 spaltender Kandidat ist ADAMTS-4. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Protease Matrilin-4 *in vitro* nicht spaltet. Als weitere Vertreter der ADAMTS Familie wurden ADAMTS-2 und -14 untersucht, da mit diesen Proteasen transfizierte Zelllinien (Colige *et al.*, 2002) durch eine Kooperation mit A. Colige (Lüttich) zur Verfügung standen. Nach Kotransfektion

der ADAMTS-2 oder -14 exprimierenden 293EBNA Zellen mit Matrilin-4 cDNA konnte in Immunoblots eine zusätzliche Matrilin-4 immunreaktive Bande identifiziert werden, die durch eine proteolytische Spaltung entstanden sein könnte (s. Abb. 3.13). Das würde bedeuten, dass diese beiden Proteasen Matrilin-4 *in vitro* spalten können. Da die Mengenverhältnisse der übrigen prozessierten Matrilin-4 Fragmente ansonsten unverändert waren, scheinen ADAMTS-2 und -14 jedoch nicht an der proteolytischen Prozessierung in der C-terminalen Scharnierregion beteiligt zu sein, sondern eine andere Schnittstelle in Matrilin-4 zu nutzen. Während es sich bei ADAMTS-4 um eine Aggrecanase handelt, die vornehmlich Proteoglykane wie z. B. Aggrecan spaltet (Sugimoto *et al.*, 1999; Tortorella *et al.*, 2000), gehören ADAMTS-2 und -14 zusammen mit ADAMTS-3 zur Gruppe der Prokollagen N-Propeptidasen (s. Porter *et al.*, 2005). ADAMTS-2 prozessiert die N-terminalen Propeptide von Prokollagen I, II und III und ADAMTS-14 die von Prokollagen I (Colige *et al.*, 1995; Colige *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003). Die Expression beider Enzyme konnte in einer Vielzahl von Geweben wie Gehirn, Knochen und Lunge nachgewiesen werden (Colige *et al.*, 1997; Colige *et al.*, 2002), in denen auch Matrilin-4 exprimiert wird (Klatt *et al.*, 2001), so dass Matrilin-4 ein physiologisches Substrat von ADAMTS-2 und -14 sein könnte. Weitere Hinweise darauf, dass Matrilin mögliche Substrate von Proteasen der ADAM/ADAMTS Familie sein könnten, lieferte eine noch nicht abgeschlossene Interaktionsstudie mit den Schlangengiftproteasen Jararhagin und Atrolysin A, die zu den Adamalysinen gehören und daher mit ADAMs und ADAMTSs verwandt sind. Dabei interagierte die Cysteinreiche Domäne von Atrolysin A mit den VWA1-Domänen von Matrilin-3 und -4, der VWA2-Domäne von Matrilin-4 sowie mit Volllänge Matrilin-1, -3 und -4 mit Dissoziationskonstanten zwischen 2 und 40 nM. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Jararhagin *in vitro* in der Lage war, Matrilin-3 und -4 zu spalten (Jay Fox, persönliche Mitteilung). Es ist daher möglich, dass es auch mit diesen Proteasen verwandte ADAMs gibt, die über ihre Cysteinreichen Domänen VWA Domänen der Matrilin binden, und die Proteine spalten können.

Eine weitere Protease, die Matrilin-4 *in vitro* spalten kann, ist die extrazelluläre humane Serinprotease Kallikrein-14 (hK14; s. Abb. 3.14), die in Zusammenarbeit mit D. Deperthes (Epalinges, Schweiz) getestet wurde. Die Identifikation von Matrilin-4 als potentiell Substrat von hK14 erfolgte in einem *phage-display screen*, in dem durch hK14 Spaltung Peptide entstanden waren, die der Sequenz von Matrilin-4, Kollagen IV, Laminin 10/11 und anderen Proteinen entsprachen (Felber *et al.*, 2005). Die Sequenz des Peptids VGSLR entspricht den Aminosäureresten 178-182 in der VWA1 Domäne von Matrilin-4 und die apparenten Molekulargewichte der Spaltprodukte von

rekombinatem Matrilin-4 nach Inkubation mit hK14 (s. Abb. 3.14) entsprechen näherungsweise den erwarteten Fragmentgrößen nach Proteolyse C-terminal von Arg<sup>182</sup>. Kallikrein-8 (hK8) ist hingegen nicht in der Lage, Matrilin-4 zu spalten. Da die Spaltung durch hK14 *in vitro* nur in Anwesenheit unphysiologisch hoher Salzkonzentrationen stattfindet, ist eine physiologische Relevanz allerdings fraglich. Es könnte jedoch sein, dass *in vivo* weitere Faktoren an diesem Prozess beteiligt sind, oder die VWA1 Domäne von Matrilin-4 durch Ligandenbindung in einer für die Proteolyse günstigeren Konformation vorliegt, als bei rekombinatem Matrilin-4. hK14 wird unter anderem im Zentralnervensystem, sowie in Brust, Haut und Prostatagewebe exprimiert (Yousef *et al.*, 2001; Hooper *et al.*, 2001; Borgoño *et al.*, 2003), kommt daher *in vivo* in einigen Geweben zusammen mit Matrilin-4 vor.

Es konnten mehrere Proteasen identifiziert werden, die Matrilin-4 *in vitro* proteolytisch spalten. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass neben der Prozessierung in der C-terminalen Scharnierregion weitere proteolytische Prozesse zum heterogenen Erscheinungsbild der Matrilin im Gewebe beitragen können. Da einige der Proteasen in den VWA Domänen der Matrilin spalten können, könnten Wechselwirkungen von Matrilinen mit ihren Liganden dadurch nachträglich in der Matrix beeinflusst werden. Andererseits könnten diese Spaltungen auch im Rahmen pathologisch bedingter oder natürlicher Abbauprozesse der extrazellulären Matrix eine Rolle spielen.

#### **4.3.3 Einfluss verschiedener Proteaseinhibitoren auf die proteolytische Prozessierung von Matrilin-4**

Der Einsatz von Proteaseinhibitoren sollte Aufschluss darüber geben, welche Proteasen an der proteolytischen Prozessierung in der Scharnierregion von Matrilin-4 beteiligt sein können. Die verwendeten Inhibitoren (s. Tab. 3.3) waren dabei jeweils für verschiedene Proteaseklassen spezifisch.

Nur ein Furin Inhibitor war in der Lage, die proteolytische Prozessierung von Matrilin-4 spezifisch und reproduzierbar zu blockieren (s. Abb. 3.15). Dieser Inhibitor hemmt Furin, PACE4 und wahrscheinlich auch weitere Subtilisin-ähnliche Proproteinkonvertasen, die ihre Substrate in der Regel C-terminal der Konsensussequenz R-X-X-R spalten (s. Rockwell *et al.*, 2002). Da in der Matrilin-4 Scharnierregion keine solche Schnittstelle enthalten ist, ist auszuschließen, dass die Prozessierung von Matrilin-4 von einer Proproteinkonvertase direkt durchgeführt wird. Wahrscheinlich aktiviert Furin oder eines seiner Familienmitglieder andere Proteasen als Bestandteil einer proteolytischen Kaskade, die zur Prozessierung von Matrilin-4 führt.

Keiner der anderen verwendeten Inhibitoren beeinflusst das Ausmaß der Prozessierung. Bei den Inhibitoren für Cystein- und Aspartatproteasen, E-64 und E-64d, bzw. Pepstatin A handelt es sich um zellgängige Substanzen, die ein breites Spektrum der jeweiligen Proteaseklassen inhibieren. Eine Beteiligung von Cystein- und Aspartatproteasen an der Matrilin-4 Prozessierung ist daher sehr unwahrscheinlich. 1,10-o-Phenanthrolin chelatiert unter anderem  $Zn^{2+}$ -Ionen und ist damit theoretisch ein Inhibitor aller Zink-abhängigen Metalloproteasen. Während mit diesem Inhibitor in einem ähnlich durchgeführten Experiment bereits nach 4-6 Stunden Inkubationsdauer ein von ADAM-Proteasen vermitteltes *shedding* von Kollagen XVII gehemmt wurde (Franzke *et al.*, 2002), hat der Inhibitor in gleicher Konzentration (100 mM) innerhalb der ersten 12 Stunden Inkubationsdauer keinen Einfluss auf die Matrilin-4 Prozessierung. In höheren Konzentrationen und nach längerer Inkubation ist der Inhibitor cytotoxisch. Es ist möglich, dass bei der intrazellulären Matrilin-4 Prozessierung ein Effekt erst nach längerer Inkubation zu sehen gewesen wäre. Demzufolge kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass Metalloproteasen an der Matrilin-4 Prozessierung beteiligt sind. Der zellgängige MMP-Inhibitor GM 6001 (Ilomastat) zeigt auch keinen Effekt, so dass eine Beteiligung von MMPs unwahrscheinlich ist. Weder für den Inhibitor von Zelloberflächen Metalloproteasen Amastatin, noch für den Serinproteaseinhibitor Aprotinin ist bekannt, ob sie die Zellmembran passieren und intrazelluläre Proteasen hemmen können. AEBSF, ein weiterer Inhibitor eines breiten Spektrums von Serinproteasen, ist wie 1,10-o-Phenanthrolin in höheren Konzentrationen und bei längerer Inkubation cytotoxisch. Leupeptin inhibiert dagegen nur einen Teil der Serinproteasen, so dass auch eine Beteiligung von Vertretern dieser Proteaseklasse nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann.

Mit den Inhibitoren wurde zwar insgesamt ein breites Spektrum an Proteasen abgedeckt, jedoch war es nur mit dem spezifischeren Furin Inhibitor möglich, die Matrilin-4 Prozessierung zu blockieren. Andere Serinproteaseinhibitoren sind offensichtlich nicht in der Lage, Furin zu inhibieren, so dass ungewiss ist, ob sie auch in ausreichender Konzentration in intrazelluläre Kompartimente gelangen konnten, in denen Matrilin-4 prozessiert wird. Solange keine weiteren Informationen über andere beteiligte Proteasen vorliegen und geeignete Positivkontrollen für das Experiment existieren, ist es für die wenigsten Inhibitoren möglich, gesicherte Aussagen im Ausschlussverfahren zu treffen.

Möglicherweise kann Matrilin-4 auch von mehreren Proteasen prozessiert werden, die zu unterschiedlichen Klassen gehören und zu deren Hemmung mehrere Inhibitoren in

Kombination eingesetzt werden müssen. In ersten Versuchen resultierte die gleichzeitige Anwendung mehrerer Inhibitoren allerdings in einer erhöhten Cytotoxizität, so dass die Experimente nicht auswertbar waren (nicht gezeigt).

Die proteolytische Prozessierung von Matrilin-4 kann wahrscheinlich von mehreren Proteasen des sekretorischen Transportweges durchgeführt werden, die von Furin aktiviert werden. Da Furin und die meisten anderen Proproteinkonvertasen frühestens im Golgi Netzwerk aktiv sind (s. Seidah & Prat, 2002), Matrilin-4 aber bereits im endoplasmatischen Retikulum prozessiert werden kann, handelt es sich dabei wahrscheinlich zumindest teilweise um Proteasen, die im Golgi aktiviert und anschließend in COP-I ummantelten Endosomen zurück zum ER transportiert werden.

### **4.4 Gewebespezifische Prozessierung von Matrilin-4**

Zur Untersuchung der Gewebeverteilung der Matrilin-4 Prozessierung wurden polyklonale, Schnittstellen spezifische Neo-Epitop Antikörper hergestellt. Diese sollten die beim rekombinanten Matrilin-4 beobachtete Spaltstelle erkennen (s. Abb. 3.16). Die Antikörper wurden in Immunoblots getestet und ein Antiserum zur weiteren Verwendung ausgewählt, welches den N-Terminus des C-terminalen Neo-Epitops und damit prozessierte Di- und Monomere (D+CC und M+2CC) von Matrilin-4 erkennt (s. Abb. 3.17). Nach Affinitätsreinigung erkannten die Antikörper spezifisch rekombinante, prozessierte Matrilin-4 Fragmente, während eine Präinkubation der Antikörper mit dem zur Immunisierung verwendeten Peptid zu einem Verlust der Signale führte (s. Abb. 3.18).

Mit diesen Antikörpern lassen sich in verschiedenen Gewebeextrakten keine prozessierten Matrilin-4 Fragmente nachweisen, da Matrilin-4 im Gewebe in weitaus geringerem Ausmaß prozessiert wird, als von 293EBNA Zellen, so dass die Menge prozessierter Matrilin-4 Fragmente wahrscheinlich unter der Detektionsgrenze liegt (s. Abb. 3.2 und 3.19). Andererseits ist es möglich, dass Matrilin-4 in den untersuchten Geweben von anderen Proteasen als in 293EBNA Zellen prozessiert wird und alternative Spaltstellen genutzt werden. Dadurch könnten andere Neo-Epitope entstehen als bei rekombinantem Matrilin-4. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Exopeptidasen die prozessierte Scharnierregion degradieren und die Neo-Epitope daher nicht nachweisbar sind.

Allerdings kann das prozessierte Monomer (M+2CC) mit den Neo-Epitop Antikörpern in Überständen primärer Chondrozyten nachgewiesen werden (s. Abb. 3.18). In diesen Überständen werden prozessierte Dimere jedoch nur von Antikörpern gegen das vollständige Protein detektiert, da sie in etwas geringerer Menge als das prozessierte

Monomer vorkommen. Außerdem entsteht beim Dimer durch Prozessierung nur ein Neo-Epitop, während von dem prozessierten Monomer zwei Arme abgeschnitten werden und zwei Neo-Epitope entstehen. Daher liegt die Menge prozessierter Dimere wahrscheinlich unter der Detektionsgrenze der Neo-Epitop Antikörper.

Mit Hilfe der Neo-Epitop Antikörper und Immunfluoreszenzdetektion konnte prozessiertes Matrilin-4 auf Gefrierschnitten neugeborener Mäuse ausschließlich in Perichondrium und Periosteum einiger skeletaler Geweben nachgewiesen werden (s. Abb. 3.21 und 3.22). Dabei wurde mit den Neo-Epitop Antikörpern kein prozessiertes Matrilin-4 in der Knorpelmatrix nachgewiesen, obwohl prozessierte Matrilin-4 Monomere im Immunoblot von Überständen primärer Chondrozyten spezifisch detektiert worden waren. Wahrscheinlich waren in der Chondrozytenkultur auch Zellen perichondrialen Ursprungs vorhanden, die für die Matrilin-4 Prozessierung verantwortlich waren. Andererseits könnten die prozessierten Neo-Epitope in der extrazellulären Matrix des Knorpels schlechter für die Antikörper zugänglich sein, als im Zellkulturüberstand der Chondrozyten.

### **4.5 Physiologische Relevanz der proteolytischen Prozessierung**

Matriline sind strukturelle Adapterproteine der extrazellulären Matrix, die verschiedene Kollagenetzwerke sowie andere Komponenten der Matrix miteinander verbinden (Wiberg *et al.*, 2003, Budde *et al.*, 2005). Dazu gehen sie starke Bindungen mit einer Vielzahl unterschiedlicher Matrixproteine ein und werden dabei teilweise sogar kovalent mit ihren Bindungspartnern verknüpft (Hauser & Paulsson, 1996). Zu ihren Liganden gehören einerseits verschiedene Kollagene, aber auch nicht-kollagene Proteine wie COMP oder Proteoglykane wie Aggrekan, Decorin und Biglykan (Paulsson & Heinegård, 1979; Winterbottom *et al.*, 1992; Piecha *et al.*, 2002; Mann *et al.*, 2004). Festphasen-Interaktionsstudien mit Matrilinen zeigten weiterhin, dass sie dabei unterschiedliche Affinitäten zu verschiedenen Liganden haben (Piecha *et al.*, 2002; Mann *et al.*, 2004) und dass die Wechselwirkung zwischen COMP und Matrilin-4 auf einem kooperativen Mechanismus basiert, da monomeres Matrilin-4 schwächer mit COMP interagiert, als ein Gemisch aus Matrilin-4 Trimeren und prozessierten Di- und Monomeren.

Durch die Prozessierung in der C-terminalen Scharnierregion werden einzelne Untereinheiten der oligomeren Matriline proteolytisch entfernt. Dadurch entstehen Isoformen der Matriline mit veränderten Bindungseigenschaften. Die heterogenen Fragmentierungsmuster der Matriline im Gewebe sind jedoch nicht nur auf proteolytische Prozessierung in der Scharnierregion zurückzuführen. In Mäusen

werden durch alternatives Spleißen Matrilin-4 Oligomere mit Untereinheiten ohne VWA1 Domäne gebildet, und bei Matrilin-2 könnte alternatives Spleißen in der *unique* Sequenz den Oligomerisierungsgrad des Proteins beeinflussen. Weitere Ergebnisse deuten darauf hin, dass extrazelluläre oder membranständige Proteasen die VWA Domänen der Matriline prozessieren könnten. Da die Interaktionen der Matriline in der Regel von den VWA Domänen vermittelt werden (Chen *et al.*, 1999; Piecha *et al.*, 2002, Mann *et al.*, 2004; H. Mann, persönliche Mitteilung), können die Bindungseigenschaften der Matriline dadurch sowohl vor der Sekretion auf posttranskriptioneller und posttranslationaler Ebene, sowie nach der Sekretion durch sezernierte Proteasen in der extrazellulären Matrix, verändert werden. Möglicherweise entstehen so verschiedene Matrilinvarianten unterschiedlicher Avidität, die jeweils auf einen engeren Kreis von Interaktionspartnern optimiert ist. Durch die damit wahrscheinlich verbundene Modulation der Adapterfunktion der Matriline, stellen proteolytische Prozessierung und alternatives Spleißen unterschiedliche Mechanismen zur Feinjustierung der Architektur der extrazellulären Matrix dar.

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, findet die proteolytische Prozessierung bereits intrazellulär in Kompartimenten des sekretorischen Transportweges statt. Einige Daten deuten darauf hin, dass Matriline ihre Interaktionspartner teilweise bereits intrazellulär binden können. So interagiert Matrilin-2 mit Prokollagen I (Piecha *et al.*, 2002) und Mutationen in COMP oder Matrilin-3, die zu einer Aggregation der Proteine im endoplasmatischen Retikulum führen (Hecht *et al.*, 2005; Otten *et al.*, 2005), resultieren wahrscheinlich in einer Ko-Retention einiger Bindungspartner von COMP und Matrilin-3 in ER und Golgi (Hecht *et al.*, 2005; C. Otten, persönliche Mitteilung). Wie bereits diskutiert, spielen die VWA2 Domänen eine wichtige Rolle bei der Zugänglichkeit der Scharnierregion für Proteasen. Da die VWA Domänen an der Ligandenbindung beteiligt sind, würde ein an die VWA2 Domäne gebundener Ligand die Scharnierregion möglicherweise zusätzlich sterisch blockieren, so dass eine proteolytische Prozessierung nach Bindung des Liganden nicht mehr möglich wäre. Daher könnte eine physiologische Notwendigkeit für eine sehr frühe Prozessierung bestehen.

Mit Hilfe der Neo-Epitop Antikörper wurde die Prozessierung von Matrilin-4 im Perichondrium und Periosteum nachgewiesen. Die Funktion von Perichondrium und Periosteum wurde bislang hauptsächlich im Zusammenhang mit der endochondralen Ossifikation beim Längenwachstum der Knochen in den Gliedmaßen untersucht. Bei diesem Vorgang kondensieren mesenchymale Zellen und differenzieren zu

Chondrozyten, während Zellen am Rand dieses Bereichs abflachen und das Perichondrium bilden. In strikt regulierter Weise beginnen die Chondrozyten zu proliferieren und differenzieren, wobei sie Komponenten der Knorpelmatrix synthetisieren. Wenn die terminale hypertrophe Differenzierung abgeschlossen ist, werden die Chondrozyten durch Osteoblasten ersetzt, die hauptsächlich perichondralen Ursprungs sind (Hinchcliff & Johnson, 1980; Erlebacher *et al.*, 1995; Colnot *et al.*, 2004). Außerdem spielt das Perichondrium eine essentielle Rolle bei der Invasion der Blutgefäße in die Knorpelmatrix (Zelzer *et al.*, 2002; Colnot *et al.*, 2004). Gleichzeitig sind Perichondrium und Periosteum wichtige Schaltstellen für viele Signalmoleküle wie *indian hedgehog* und verschiedene BMPs (*bone morphogenetic protein*), Mitgliedern der TGF- $\beta$ 1 Oberfamilie, die Differenzierungsvorgänge während der endochondralen Ossifikation steuern (Vortkamp *et al.*, 1996; Alvarez *et al.*, 2001; Colnot *et al.*, 2005; zur Übersicht s. Vortkamp, 2001). Damit die mit diesen Prozessen verbundenen Vorgänge wie Zellmigration und der rege Austausch diffusibler Signalmoleküle ordnungsgemäß stattfinden können, wird wahrscheinlich eine andere Architektur der extrazellulären Matrix benötigt, als im Knorpel oder Knochen. Alle Matriline wurden in perizellulären Netzwerken gefunden (Chen *et al.*, 1995; Piecha *et al.*, 1999; Klatt *et al.*, 2000; Klatt *et al.*, 2001) und beeinflussen als Adapterproteine möglicherweise deren Vernetzungsgrad. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Knorpelmatrix von Mäusen, die defizient für Matrilin-1 und -3 waren, konnten Kollagenfibrillen, die bei wildtypischen Mäusen hauptsächlich in der extraterritorialen Matrix vorhanden waren, auch im perizellulären Raum beobachtet werden, außerdem hatten die Kollagenfibrillen einen größeren Durchmesser (A. Aszódi, persönliche Mitteilung). Daher könnten Matriline unter anderem eine Funktion bei der Organisation perizellulärer Netzwerke haben. Die proteolytische Prozessierung von Matrilin-4 in der C-terminalen Scharnierregion führt zu einer Modulation der Bindungseigenschaften des Proteins und könnte dadurch die Architektur dieser Netzwerke beeinflussen. Somit könnte die Prozessierung von Matrilin-4 im Perichondrium und Periosteum dazu beitragen, dass diese Gewebe ihren besonderen Anforderungen während der Entwicklung gerecht werden.

#### 4.6 Ausblick

Mehrere Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die VWA2 Domänen der Matriline die proteolytische Prozessierung beeinflussen. Die Aufklärung der Kristallstrukturen der Matriline könnte weiteren Aufschluss darüber geben, ob diese Domänen die Zugänglichkeit der benachbarten Scharnierregion für Proteasen

tatsächlich sterisch beeinflussen. Aufgrund der hohen Tendenz der Matriline, in Lösung zu aggregieren und präzipitieren, waren allerdings sämtliche Versuche, die VWA Domänen der Matriline zu kristallisieren, bislang erfolglos. Der Einfluss der VWA2 Domänen auf die Prozessierung könnte daher zunächst durch Analyse der Prozessierung rekombinanter, chimärer Matriline mit VWA2 Domänen anderer Matriline untersucht werden, beispielsweise durch Insertion der VWA2 Domäne von Matrilin-1 in Matrilin-3 oder dem Austausch der Matrilin-4 VWA2 Domäne gegen die von Matrilin-1.

Die Bestimmung alternativer Prozessierungsstellen in der *unique* Sequenz von Matrilin-2 wurde bislang dadurch verhindert, dass die C-terminale Markierung vor der Aufreinigung verloren ging. Die Prozessierung könnte daher in verkürzten Matrilin-2 Konstrukten mit unterschiedlichen Affinitätsmarkierungen an beiden Termini, die z. B. nur aus der VWA2 Domäne und der *unique* Sequenz bestehen, untersucht werden.

Interaktionsstudien mit Matrilin-2, -3 und -4 wurden bislang entweder mit monomeren Matrilinen, einzelnen Domänen, oder einem Gemisch aus unterschiedlich prozessierten und unprozessierten Oligomeren durchgeführt. Um Aviditätsunterschiede prozessierter und unprozessierter Matriline genauer zu untersuchen, wäre es notwendig, Interaktionsstudien mit überwiegend unprozessierten oder dimeren Formen der Matriline durchzuführen. Mit Hilfe des Furin Inhibitors könnte die Prozessierung während der rekombinanten Expression unterbunden werden, um unprozessierte Matriline zu erhalten. Der Inhibitor hatte selbst in hoher Konzentration keinen negativen Einfluss auf die Proteinexpression oder Zellviabilität. Dimere Matriline könnten durch einen Austausch der tri- oder tetrameren Matrilin *coiled-coil* Domänen gegen eine dimerisierende *coiled-coil* Domäne eines anderen Proteins erzeugt werden. Zwar scheinen die Interaktionen der Matriline nicht von ihren *coiled-coil* Domänen vermittelt zu werden (Mann *et al.*, 2004), allerdings wäre dabei ein möglicher Einfluss anderer *coiled-coil* Domänen auf die Interaktionen zusätzlich experimentell auszuschließen.

Eine physiologische Bedeutung der Prozessierung der Matriline könnte in transgenen Mäusen untersucht werden, die Matrilin-4 mit einer Mutation der Proteaseschnittstelle exprimieren. Um die Kompensation eines möglichen Phänotyps durch andere prozessierte Matriline zu vermeiden, müssten diese Mäuse gleichzeitig defizient für die anderen Matriline sein.

## 5 Zusammenfassung

Die vier Matriline bilden eine Familie nicht kollagener, oligomerer Adapterproteine der extrazellulären Matrix. Indem sie unterschiedliche Kollagennetzwerke miteinander und mit anderen Matrixproteinen verbinden, sind sie an der Organisation perizellulärer Netzwerke beteiligt. Die Oligomerisierung von Matrilinuntereinheiten zu Tri- oder Tetrameren wird durch ihre C-terminalen *coiled-coil* Domänen vermittelt, die über eine kurze Scharnierregion mit dem Rest der Untereinheiten verbunden sind. Rekombinantes Matrilin-4 wird in dieser Scharnierregion C-terminal zweier konservierter Glutamatreste proteolytisch prozessiert, so dass mono- und dimere Moleküle mit weiterhin trimeren *coiled-coil* Domänen entstehen. Da Interaktionen von Matrilinen mit ihren Liganden kooperativ sind, werden die Bindungseigenschaften der Matriline durch eine solche proteolytische Prozessierung moduliert.

Eine biochemische Analyse zeigte, dass alle Matriline im Gewebe und nach rekombinanter Expression proteolytisch prozessiert werden. Die SDS-PAGE Bandenmuster von Matrilinen aus Geweben sind komplexer als die der entsprechenden rekombinanten Proteine. Dabei spielen weitere Mechanismen, wie z. B. alternatives Spleißen muriner Matrilin-4 Transkripte, eine Rolle. Die Analyse der Prozessierungsmuster rekombinanter Matriline mit Mutationen in den Scharnierregionen ergab, dass das konservierte „EE“-Motiv in allen Matrilinen als Schnittstelle für Proteasen dient. Matrilin-3 besitzt zusätzliche Schnittstellen in der Scharnierregion, Matrilin-2 wahrscheinlich in der *unique* Sequenz N-terminal der Scharnierregion. Somit stellen die Scharnierregionen kurze, für Proteasen angreifbare Sequenzen dar. Ausmaß und Spezifität der Prozessierung scheinen von der Zugänglichkeit der Scharnierregion für Proteasen abzuhängen, die von der räumlichen Anordnung der benachbarten VWA2 Domäne und der Länge der Scharnierregion beeinflusst werden könnte. Weitere Experimente zeigten, dass die Prozessierung von rekombinatem Matrilin-4 bereits sehr früh in Kompartimenten des sekretorischen Transportweges stattfindet und von Enzymen durchgeführt wird, die zu einer Furin-abhängigen proteolytischen Kaskade gehören. Zum Nachweis von prozessiertem Matrilin-4 im Gewebe wurden Schnittstellen-spezifische Neo-Epitop Antikörper hergestellt und charakterisiert. Mit ihrer Hilfe konnten durch Prozessierung entstandene Matrilin-4 Neo-Epitope in Überständen primärer muriner Chondrozyten und im Perichondrium und Periosteum einiger skeletaler Gewebe neugeborener Mäuse detektiert werden. Eine proteolytische Regulation der Avidität der Matriline könnte daher die Fähigkeit der Matriline beeinflussen, Komponenten der extrazellulären Matrix skeletaler Gewebe miteinander zu verbinden.

## 6 Abstract

The four matrilins comprise a family of non-collagenous oligomeric adaptor proteins in the extracellular matrix. By interconnecting different collagen networks with each other and with other matrix proteins they play a role in the organisation of pericellular networks. The assembly of matrilin trimers or tetramers is mediated by their C-terminal coiled-coil domains, which are linked to the rest of the subunits by a short hinge region. Matrilin-4 undergoes proteolytic processing C-terminal of two conserved glutamate residues in this hinge region, which results in the formation of dimers and monomers with still trimeric coiled-coil domains. As interactions of matrilins with their ligands are cooperative, this processing modulates matrilin binding properties.

Biochemical analysis revealed a proteolytic processing of all matrilins in tissues and upon recombinant expression. The size patterns of tissue matrilins are more complex than those of the corresponding recombinant proteins, presumably due to additional mechanisms such as alternative splicing of murine matrilin-4 transcripts. An analysis of processed recombinant matrilins carrying mutations in the hinge region showed that the conserved "EE"-motif serves as a protease cleavage site in all matrilins. Matrilin-3 has additional cleavage sites in the hinge region and in matrilin-2 additional cleavage probably takes place in the unique domain N-terminal of the hinge region. Thus, the hinge regions are short, protease-sensitive sequences. Extent and specificity of processing seem to depend on the accessibility of the hinge region for proteases, which may be influenced by the spatial arrangement of the adjacent VWA2 domain and the length of the hinge region. Further experiments showed that processing of recombinant matrilin-4 occurs very early in compartments of the secretory pathway and depends on enzymes that belong to a furin-dependent proteolytic cascade. For detection of processed matrilin-4 in tissue, cleavage-site-specific neo-epitope antibodies were generated and characterised. Thereby, matrilin-4 neo-epitopes that originated from processing could be detected in conditioned media of primary murine chondrocytes and in perichondrium and periosteum of several skeletal tissues in newborn mice. A proteolytic regulation of matrilin avidity could hence influence the ability of matrilins to connect macromolecular components in the extracellular matrix of developing cartilage and bone.

## 7 Literaturverzeichnis

- Alvarez, J., Horton, J., Sohn, P. & Serra, R. (2001) *The perichondrium plays an important role in mediating the effects of TGF- $\beta$ 1 on endochondral bone formation*. *Dev Dyn* **221**: 311-321
- Amoscato, A. A., Alexander, J. W. & Babcock, G. F. (1989) *Surface aminopeptidase activity of human lymphocytes. Biochemical and biologic properties of intact cells*. *J Immunol* **142**(4): 1245-1252
- Anderson, E. D., Molloy, S. S., Jean, F., Fei, H., Shimamura S. & Thomas, G. (2002) *The ordered and compartment-specific autoproteolytic removal of the furin intramolecular chaperone is required for enzyme activation*. *J Biol Chem* **277** (15): 12879-12890
- Aszódi, A., Hauser, N., Studer, D., Paulsson, M., Hiripi, L. & Bösze, Z. (1996) *Cloning, sequencing and expression analysis of mouse cartilage matrix protein cDNA*. *Eur J Biochem* **236**: 970-977
- Aszódi, A., Bateman, J. F., Hirsch, E., Baranyi, M., Hunziker, E. B., Hauser, N., Bösze, Z. & Fässler, R. (1999) *Normal skeletal development of mice lacking matrilin 1: Redundant function of matrilins in cartilage*. *Mol Cell Biol* **19**: 7841-7845
- Banyard, J., Bao, L. & Zetter, B. R. (2003) *Type XXIII collagen, a new transmembrane collagen identified in metastatic tumor cells*. *J Biol Chem* **278**: 20989-20994
- Barrett, A. J., Kembhavi, A. A., Brown, M. A., Kirschke, H., Knight, C. G., Tamai, M. & Hanada, K. (1982) *L-trans-Epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L*. *Biochem J* **201**(1): 189-198
- Benistant, C., Moehren, G., Gustavsson, L., Torres-Marquez, E., Hoek, J. B. & Rubin, R. (1994) *Leupeptin inhibits phospholipases D and C activation in rat hepatocytes*. *Biochim Biophys Acta* **123**(1): 84-90
- Beynon, R. J. & Bond, J. S. (Eds.) *Proteolytic enzymes: a practical approach*. ILR Press, Oxford (1989)
- Billinghurst, R. C., Wu, W., Ionescu, M., Reiner, A., Dahlberg, L., Chen, J., van Wart, H., & Poole, A. R. (2000) *Comparison of the degradation of type II collagen and proteoglycan in nasal and articular cartilages induced by interleukin-1 and the selective inhibition of type II collagen cleavage by collagenase*. *Arthritis Rheum* **43**: 664-672
- Blobel, G. (1987) *How proteins move across the endoplasmic reticulum membrane*. *Hepatology* **7** Suppl. 1: 26S-29S
- Borgoño, C. A., Grass, L., Soosaipillai, A., Yousef, G. M., Petraki, C. D., Howarth, D. H. C., Fracchioli, S., Katsaros, D. & Diamandis, E. P. (2003) *Human kallikrein 14: a new potential biomarker for ovarian and breast cancer*. *Cancer Res* **63**: 9032-9041
- Borgoño, C. A., Michael, I. P. & Diamandis, E. P. (2004) *Human tissue kallikreins, physiologic roles and applications in cancer*. *Mol Cancer Res* **2**: 257-280
- Borgoño, C. A. & Diamandis, E. P. (2004) *The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer*. *Nat Rev Cancer* **4**: 876-890
- Borochowitz, Z. U., Scheffer, D., Adir, V., Dagoneau, N., Munnich, A. & Cormier-Daire, V. (2004) *Spondylo-epi-metaphyseal dysplasia (SEMD) matrilin-3 type: Homozygot matrilin-3 mutation in a novel form of SEMD*. *J Med Genet* **41**: 366-372
- Brunkan, A. L. & Goate, A. M. (2005) *Presenilin function and  $\gamma$ -secretase activity*. *J Neurochem* **93**: 769-792
- Buckner, J. H., Wu, J. J., Reife, R. A., Terato, K. & Eyre, D. R. (2000) *Autoreactivity against matrilin-1 in a patient with relapsing polychondritis*. *Arthritis Rheum* **43**(4): 939-943
- Budde, B., Blumbach, K., Ylöstalo, J., Zaucke, F., Ehlen, H. W. A., Wagener, R., Ala-Kokko, L., Paulsson, M., Bruckner, P. & Grässel, S. (2005) *Altered integration of matrilin-3 into cartilage extracellular matrix in the absence of collagen IX*. *Mol Cell Biol* **25** (23): 10465-10478

- Buttle, D. J., Murata, M., Knight, C. G. & Barrett, A. J. (1992) *CA074 methyl ester: a proinhibitor for intracellular cathepsin B*. Arch Biochem Biophys **299**(2): 377-380
- Buxbaum, J. D., Liu, K.-N., Luo, Y., Slack, J. L., Stocking, K. L., Peschon, J. J., Johnson, R. S., Castner, B. J., Cerretti, D. P. & Black, R. (1998) *Evidence that tumor necrosis factor converting enzyme is involved in regulated  $\alpha$ -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor*. J Biol Chem **273**: 27765-27767
- Cal, S., Arguelles, J. M., Fernandez, P.L. & Lopez-Otin, C. (2001) *Identification, characterization, and intracellular processing of ADAM-TS12, a novel human disintegrin with a complex structural organization involving multiple thrombospondin-1 repeats*. J Biol Chem **276** (21): 17932-17940
- Carlin, C., Phillips, P. D., Brooks-Frederich, K., Knowles, B. B. & Cristofalo, V. J. (1994) *Cleavage of the epidermal growth factor receptor by a membrane-bound leupeptin-sensitive protease active in nonionic detergent lysates of senescent but not young human diploid fibroblasts*. J Cell Physiol **160**(3): 427-434
- Chapman, K. L., Mortier, G., R., Chapman, K., Loughlin, J., Grant, M. E. & Briggs, M. D. (2001) *Mutations in the region encoding the von Willebrand factor A domain of matrilin-3 are associated with multiple epiphyseal dysplasia*. Nat Genet **28**: 393-396
- Chen, Q., Johnson, D. M., Haudenschild, D. R., Tondravi, M. M. & Goetinck, P. F. (1995) *Cartilage matrix protein forms a type II collagen-independent filamentous network: Analysis in primary cell cultures with a retrovirus expression system*. Mol Biol Cell **6**: 1743-1753
- Chen, Q., Zhang, Y., Johnson, D. M. & Goetinck, P. F. (1999) *Assembly of a novel cartilage matrix protein filamentous network: molecular basis of differential requirement of von Willebrand factor A domains*. Mol Biol Cell **10**: 2149-2162
- Colige, A., Beschin, A., Samyn, B., Goebels, Y., van Beeumen, J., Nusgens, B. V. & Lapière, C. M. (1995) J Biol Chem **270**: 16724-16730
- Colige, A., Li, S.-W., Sieron, A. L., Nusgens, B. V., Prockop, D. J., & Lapière, C. M. (1997) *cDNA cloning and expression of bovine procollagen I N-proteinase: a new member of the superfamily of zinc-metalloproteinases with binding sites for cells and other matrix components*. Proc Natl Acad Sci USA **94**: 2374-2379
- Colige, A., Vandenberghe, I., Thiry, M., Lambert, C. A., Van Beeumen, J., Li, S. W., Prockop, D. J., Lapière, C. M. & Nusgens, B. V. (2002) *Cloning and characterization of ADAMTS-14, a Novel ADAMTS displaying high homology with ADAMTS-2 and ADAMTS-3*. J Biol Chem **277** (8): 5756-5766
- Colnot, C., Lu, C., Hu, D. & Helms, J. A. (2004) *Distinguishing the contributions of the perichondrium, cartilage and vascular endothelium to skeletal development*. Dev Biol **269**: 55-69
- Colnot, C., de la Fuente, L., Huang, S., Hu, D., St-Jacques, B. & Helms, J. A. (2005) *Indian hedgehog synchronizes skeletal angiogenesis and perichondral maturation with cartilage development*. Development **132**: 1057-1067
- Cotterill, S. L., Jackson, G. C., Leighton, M. P., Wagener, R., Mäkitie, O., Cole, W. G. & Briggs, M. D. (2005) *Multiple epiphyseal dysplasia mutations in MATN3 cause misfolding of the A-domain and prevent secretion of mutant matrilin-3*. Hum Mut **26**: 557-565
- Cowell, S., Knäuper, V., Stewart, M. L., d'Ortho, M.-P., Stanton, H., Hembry, R. M., López-Otín, C., Reynolds, J. J. & Murphy, G. (1998) *Induction of matrix metalloproteinase activation cascades based on membrane-type 1 matrix metalloproteinase: associated activation of gelatinase A, gelatinase B and collagenase 3*. Biochem J **331**: 453-458
- Dames, S. A., Kammerer, R. A., Wiltschek, R., Engel, J. & Alexandrescu, A. T. (1998) *NMR structure of a parallel homotrimeric coiled-coil*. Nat Struct Biol **5**: 687-691
- Davies, D. R. (1990) *The structure and function of the aspartic proteinases*. Annu Rev Biophys Biophys Chem **19**: 189-215
- Deák, F., Piecha, D., Bachrati, C., Paulsson, M. & Kiss, I. (1997) *Primary structure and expression of matrilin-2, the closest relative of cartilage matrix protein within the von Willebrand factor type-A module superfamily*. J Biol Chem **272**: 9268-9274

- Deák, F., Wagener, R., Kiss, I. & Paulsson, M. (1999) *The matrilins: a novel family of oligomeric extracellular matrix proteins*. *Matrix Biol* **18**: 55-66
- Denault, J.-B., d'Orleans-Juste, P., Masaki, T. & Leduc, R. (1995) *Inhibition of convertase-related processing of proendothelin-1*. *J Cardiovasc Pharmacol* **26** Suppl 3: S47-S50
- Deryugina, E. I., Ratnikov, B., Monosov, E., Postnova, T. I., di Scipio, R., Smith, J. W. & Strongin, A. Y. (2001) *MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin  $\alpha\beta 3$  promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells*. *Exp Cell Res* **263**: 209-223
- de Strooper, B., Beullens, M., Contreras, B., Levesque, L., Craessaerts, K., Cordell, B., Moechars, D., Bollen, M., Fraser, P., George-Hyslop, P. S. & Van Leuven, F. (1997) *Phosphorylation, subcellular localization, and membrane orientation of the Alzheimer's disease-associated presenilins*. *J Biol Chem* **272** (6): 3590-3598
- Ehlen, H. (2002) *Untersuchungen der potentiellen Proteaseschnittstelle im C-terminalen Bereich der Matriline mittels site-directed-mutagenesis*. Diplomarbeit, Universität zu Köln
- English, W. R., Puente, X. S., Freije, J. M., Knauper, V., Amour, A., Merryweather, A., Lopez-Otin, C. & Murphy, G. (2000) *Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor- $\alpha$  convertase activity but does not activate pro-MMP2*. *J Biol Chem* **275**: 14046-14055
- Erlebacher, A., Filvaroff, E. H., Gitelman, S. E. & Derynck, R. (1995) *Toward a molecular understanding of skeletal development*. *Cell* **80**: 371-378
- Felber, L. M., Borgono, C. A., Cloutier, S. M., Kündig, C., Kishi, T., Robeiro Chagas, J., Jichlinski, P., Gygi, C. M., Leisinger, H. J., Diamandis, E. P. & Deperthes, D. (2005) *Enzymatic profiling of human kallikrein 14 using phage-display substrate technology*. *Biol Chem*, **386**: 291-298
- Frank, S., Schulthess, T., Landwehr, R., Lustig, A., Mini, T., Jenö, P., Engel, J. & Kammerer, R. A. (2002) *Characterization of the matrilin coiled-coil domains reveals seven novel isoforms*. *J Biol Chem* **277**: 19071-19079
- Franzke, C.-W., Tasanen, K., Schäcke, H., Zhou, Z., Tryggvason, K., Mauch, C., Zigrino, P., Sunarborg, S., Lee, D. C., Fahrenholz, F. & Brückner-Tuderman, L. (2002) *Transmembrane collagen XVII, an epithelial adhesion protein, is shed from the cell surface by ADAMs*. *EMBO J* **21**: 5026-5035
- Galardy, R. E., Grobelny, D., Foellmer, H. G. & Fernandez, L. A. (1994a) *Inhibition of angiogenesis by the matrix metalloprotease inhibitor N-[2R-2-(hydroxamidocarbonylmethyl)-4-methylpentanoyl]-L-tryptophan methylamide*. *Cancer Res* **54**(17): 4715-4718
- Galardy, R. E., Cassabonne, M. E., Giese, C., Gilbert, J. H., Lapierre, F., Lopez, H., Schaefer, M. E., Stack, R., Sullivan, M., Summers, B., Tressler, R., Tyrrell, D., Wee, J., Allen, S. D., Castellot, J. J., Barletta, J. P., Shultz, G. S., Fernandez, L. A., Fisher, S., Cui, T., Foellmer, H. G., Grobelny, D. & Holleran, W. M. (1994b) *Low molecular weight inhibitors in corneal ulceration*. *Ann NY Acad Sci* **732**: 315-323
- Gao, G., Westling, J., Thompson, V. P., Howell, T. D., Gottschall, P. E. & Sandy, J. D. (2002) *Activation of the proteolytic activity of ADAMTS-4 (aggrecanase-1) by C-terminal truncation*. *J Biol Chem* **277**: 11034-11041
- Garten, W., Hallenberger, S., Ortmann, D., Schafer, W., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E. & Klenk, H. D. (1994) *Processing of viral glycoproteins by the subtilisin-like endoprotease furin and its inhibition by specific peptidylchloroalkylketones*. *Biochimie* **76** (3-4): 217-225
- Golubkov, V. S., Boyd, S., Savinov, A. Y., Chekanov, A. V., Osterman, A. L., Remacle, A., Rozanov, D. V., Doxsey, S. J. & Strongin, A. Y. (2005) *Membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) exhibits an important intracellular cleavage function and causes chromosome instability*. *J Biol Chem* **280** (26): 25079-25086
- Goto, T., Yamaza, T. & Tanaka, T. (2003) *Cathepsins in the osteoclast*. *J Electron Microsc* **52**: 551-558
- Gray, E. S. & Tsai, R. W. (1994) *Characterization of striped bass growth hormone receptors by disulfide-bond reduction and cross-linking studies*. *J Exp Zool* **268**(6): 428-435
- Handford, P. A., Mayhew, M., Baron, M., Winship, P. R., Campbell, D. I. & Brownlee, G. G. (1991), *Key residues involved in calcium-binding motifs in EGF-like domains*. *Nature* **351**: 164-167

- Hansen, J. Billich, S., Schulze, T., Sukrow, S. & Moelling, K. (1988) *Partial purification and substrate analysis of bacterially expressed HIV protease by means of monoclonal antibody*. EMBO J **7**: 1785-1791
- Hansson, A. S., Heinegård, D. & Holmdahl, R. (1999) *A new animal model for relapsing polychondritis, induced by cartilage matrix protein (matrilin-1)*. J Clin Invest **104**: 589-598
- Hansson, A. S., Heinegård, D., Piette, J. C., Burkhardt, H & Holmdahl, R. (2001) *The occurrence of autoantibodies to matrilin-1 reflects tissue-specific response to cartilage of the respiratory tract in patients with relapsing polychondritis*. Arthritis Rheum **44**: 2402-2412
- Hansson, A. S., Johannesson, M., Svensson, L., Nandakumar, K. S., Heinegård, D. & Holmdahl, R. (2004) *Relapsing polychondritis, induced in mice with matrilin-1, is an autoantibody- and complement-dependent disease*. Am J Pathol **164**: 959-966
- Hartmann, D., de Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lubke, T., Lena Illert, A., von Figura, K. & Saftig, P. (2002) *The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for  $\alpha$ -secretase activity in fibroblasts*. Hum Mol Genet **11**: 2615-2624
- Hauser, N. & Paulsson, M. (1994) *Native cartilage matrix protein (CMP). A compact trimer of subunits assembled via a coiled-coil  $\alpha$ -helix*. J Biol Chem **269**: 25747-25753
- Hauser, N., Paulsson, M., Heinegård, D. & Mörgelin, M. (1996) *Interaction of cartilage matrix protein with aggrecan. Increased covalent cross-linking with tissue maturation*. J Biol Chem **271**: 32247-32252
- Heathfield, T. F., Önerfjord, P., Dahlberg, L. & Heinegård, D. (2004) *Cleavage of ibromodulin in cartilage explants involves removal of the N-terminal tyrosine sulfate-rich region by proteolysis at a site that is sensitive to matrix metalloproteinase-13*. J Biol Chem **279**: 6286-6295
- Hecht, J. T., Hayes, E., Haynes, R. & Cole, W. G. (2005) *COMP mutations, chondrocyte function and cartilage matrix*. Matrix Biol **23**: 525-533
- Hewlett, G. (1990) *Apropos aprotinin: a review*. Biotechnology **8**: 565-567
- Hinchcliffe, J. R. & Johnson, D. R. (Eds.) *The development of the vertebrate limb*. New York: Oxford University Press, 1980
- Hooper, J. D., Bui, L. T., Rae, F. K., Harvey, T. J., Myers, S. A., Ashworth, L. K. & Clements, J. A. (2001) *Identification and characterization of KLK14, a novel kallikrein serine protease gene located on human chromosome 19q13.4 and expressed in prostate and skeletal muscle*. Genomics **73**: 117-122
- Huang, X., Birk, D. E. & Goetinck, P. F. (1999) *Mice lacking matrilin-1 (cartilage matrix protein) have alterations in type II collagen fibrillogenesis and fibril organization*. Dev Dyn **216**: 434-441
- Itoh, Y., Kajita, M., Kinoh, H., Mori, H., Okada, A. & Seiki, M. (1999) "Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP, MMP-17) is a glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteinase", *J Biol Chem*, **274**, 34260-34266
- Iwatsubo, T. (2004) *The  $\gamma$ -secretase complex: machinery for intramembrane proteolysis*. Curr Opin Neurobiol **14**: 379-383
- Jackson, G. C., Barker, F. S., Jakkula, E., Czarny-Ratajczak, M., Makitie, O., Cole, W. G., Wright, M. J., Smithson, S. F., Suri, M., Rogala, P., Mortier, G. R., Baldock, C., Wallace, A., Elles, R., Ala-Kokko, L. & Briggs, M. D. (2004) *Missense mutations in the  $\beta$  strands of the single A-domain of matrilin-3 result in multiple epiphyseal dysplasia*. J Med Genet **41**: 52-59
- Kaether, C., Lammich, S., Edbauer, D., Ertl, M., Rietdorf, J., Capell, A., Steiner, H. & Haass, C. (2002) *Presenilin affects trafficking and processing of betaAPP and is targeted in a complex with nicastrin to the plasma membrane*. J Cell Biol **158**: 551-561
- Kamphuis, I. G., Kaqk, H. H., Swarte, M. B. & Drenth, J. (1984) *Structure of papain refined at 1,65 Å resolution*. J Mol Biol **179**: 233-256
- Kamphuis, I. G., Drenth, J. & Baker, E. N. (1985) *Thiol proteases: Comparative studies based on the high-resolution structures of papain and actinidin, and on amino acid sequence information for cathepsins B and H, and stem bromelain*. J Mol Biol **182**: 317-329

- Kiss, I., Deák, F., Holloway, R. G. jr., Delius, H., Mebust, K. A., Frimberger, E., Argraves, W. S., Tsonis, P. A., Winterbottom, N. & Goetinck, P. F. (1989) *Structure of the gene for cartilage matrix protein, a modular protein of the extracellular matrix: exon/intron organization, unusual splice sites, and relations to alpha chains of beta 2 integrins, von Willebrand factor, complement factors B and C2, and epidermal growth factor* J Biol Chem **264**: 8126-8134
- Klatt, A. R., Nitsche, P. D., Kobbe, B., Mörgelin, M., Paulsson, M. & Wagener, R. (2000) *Molecular structure and tissue distribution of Matrilin-3, a filament forming extracellular matrix protein expressed during skeletal development.* J Biol Chem **275**: 3999-4006
- Klatt, A. R. (2001) *Struktur, Prozessierung und Gewebeverteilung von Matrilin-3 und Matrilin-4.* Dissertation, Universität zu Köln
- Klatt, A. R., Nitsche, D. P., Kobbe, B., Macht, M., Paulsson, M. & Wagener, R. (2001) *Molecular structure, processing, and tissue distribution of matrilin-4.* J Biol Chem **276** (20): 17267-17275
- Klatt A. R., Paulsson, M. & Wagener, R. (2002) *Expression of matrilins during maturation of mouse skeletal tissues.* Matrix Biol **21**: 289-296
- Kleemann-Fischer, D., Kleemann, G. R., Engel, D., Yates, J. R. 3rd, Wu, J. J. & Eyre, D. R. (2001) *Molecular properties of matrilin-3 isolated from human growth cartilage.* Arch Biochem Biophys **387** (2): 209-215
- Knäuper, V., Will, H., López-Otín, C., Smith, B., Atkinson, S. J., Stanton, H., Hembry, R. M. & Murphy, G. (1996) *Cellular mechanisms for human procollagenase-2 (MMP-13) activation.* J Biol Chem **271**: 17124-17131
- Ko, Y. P., Kobbe, B., Nicolae, C., Miosge, N., Paulsson, M., Wagener, R. & Aszódi, A. (2004) *Matrilin-3 is dispensable for mouse skeletal growth and development.* Mol Cell Biol **24**: 1691-1699
- Ko, Y. P., Kobbe, B., Paulsson, M. & Wagener, R. (2005) *Zebrafish (Danio rerio) Matrilins: shared and divergent characteristics with their mammalian counterparts.* Biochem J **386**: 367-379
- Kohfeldt, E., Maurer, P., Vannahme, C., and Timpl, R. (1997) *Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican.* FEBS Lett **414**: 557-561
- Koike, H., Tomioka, S., Sorimachi, H., Saido, T. C., Maruyama, K., Okuyama, A., Fujisawa-Sehara, A., Ohno, S., Suzuki, K. & Ishiura S. (1999) *Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein.* Biochem J **343**: 371-375
- Kojima, S., Itoh, Y., Matsumoto, S., Masuho, Y. & Seiki, M. (2000) *Membrane type 6 matrix metalloproteinase (MT6-MMP, MMP-25) is the second glycosyl phosphatidyl inositol (GPI)-anchored MMP.* FEBS Lett **480**: 142-146
- Kraut, J. (1977) *Serine proteases: Structure and mechanism of catalysis.* Annu Rev Biochem **49**: 331-358
- Kuno, K. & Matsushima, K. (1998) *ADAMTS-1 protein anchors at the extracellular matrix through the thrombospondin type I motifs and its spacing region.* J Biol Chem **273**: 13912-13917
- Lammers, G. & Jamieson, J. C. (1988) *The role of a cathepsin D-like activity in the release of Gal beta 1-4GlcNAc alpha 2-6-sialyltransferase from rat liver golgi membranes during the acute-phase response.* Biochem J **256**: 623-631
- Laemmli, U. (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature **227**: 680-685
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C. & Fahrenholz, F. (1999) *Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin-metalloprotease.* Proc Natl Acad Sci USA **96**: 3922-3927
- Laping, N. J., Grygielko, E., Mathur, A., Butter, S., Bomberger, J., Tweed, C., Martin, W., Fornwald, J., Lehr, R., Harling, J., Gaster, L., Callahan, J. F. & Olson, B. A. (2002) *Inhibition of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF-beta type I receptor kinase activity: SB-431542.* Mol Pharmacol **62**: 58-64

- Lawson, W. B., Valenty, V. B., Wos, J. D. & Lobo, A. P. (1982) *Studies on the inhibition of human thrombin: effects of plasma and plasma constituents*. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch* **109**: 52-60
- Lee, J. O., Rieu, P., Arnaout, M. A. & Liddington R. (1995) *Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18)*. *Cell* **80** (4): 631-638
- Limb, G. A., Matter, K., Murphy, G., Cambrey, A. D., Bishop, P. N., Morris, G. E. & Khaw, P. T. (2005) *Matrix metalloproteinase-1 associates with intracellular organelles and confers resistance to lamin A/C degradation during apoptosis*. *Am J Pathol* **166**: 1555-1563
- Liu, J., Sukhova, G. K., Sun, J.-S., Xu, W.-H., Libby, P. & Shi, H.-P. (2004) *Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**: 1359-1366
- Lovejoy, B., Welch, A. R., Carr, S., Luong, C., Broka, C., Hendricks, R. T., Campbell, J. A., Walker, K. A., Martin, R., van Wart, H. & Browner, M. F. (1999) *Crystal structures of MMP-1 and -13 reveal the structural basis for selectivity of collagenase inhibitors*. *Nat Struct Biol* **6**: 217-221
- Lovgren, J., Airas, K. & Lilja, H. (1999) *Enzymatic action of human glandular kallikrein 2 (hK2). Substrate specificity and regulation by Zn<sup>2+</sup> and extracellular protease inhibitors*. *Eur J Biochem* **262**: 781-789
- Lunn, G. & Sansone, E. B. (1994) *Degradation and disposal of some enzyme inhibitors. Scientific note*. *Appl Biochem Biotechnol* **48**: 57-59
- Luo, D., Mari, B., Stoll, I. & Anglard, P. (2002) *Alternative splicing and promoter usage generates an intracellular stromelysin-3 isoform directly translated as an active matrix metalloproteinase*. *J Biol Chem* **277** (28): 25527-25536
- Mabuchi, A., Haga, N., Maeda, K., Nakashima, E., Manabe, N., Hiraoka, H., Kitoh, H., Kosaki, R., Nishimura, G., Ohashi, H. & Ikegawa, S. (2004) *Novel and recurrent mutations clustered in the von Willebrand factor A domain of MATN3 in multiple epiphyseal dysplasia*. *Hum Mutat* **24**:439-440
- Mains, R. E., Berard, C. A., Denault, J. B., Zhou, A., Johnson, R. C. & Leduc, R. (1997) *PACE4: a subtilisin-like endoprotease with unique properties*. *Biochem J* **321**: 587-593
- Malby, S., Pickering, R., Saha, S., Smallbridge, R., Linse, S. & Downing, A. K. (2001) *The first epidermal growth factor-like domain of the low-density lipoprotein receptor contains a noncanonical calcium binding site*. *Biochemistry* **40**: 2555-2563
- Malfait, A. M., Liu, R. Q., Ijiri, K., Komiya, S. & Tortorella, M. D. (2002) *Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage*. *J Biol Chem* **277**: 22201-22208
- Malm, J., Hellman, J., Hogg, P. & Lilja, H. (2000) *Enzymatic action of prostate specific antigen (PSA or hK3): substrate specificity and regulation by Zn<sup>2+</sup>, a tight-binding inhibitor*. *Biol Chem* **383**: 1107-1112
- Mann, H. H., Özbeck, S., Engel, J., Paulsson, M. & Wagener, R. (2004) *Interactions between the cartilage oligomeric matrix protein and matrilins. Implications for matrix assembly and pathogenesis of chondrodysplasias*. *J Biol Chem* **279**: 25294-25298
- Martel-Pelletier, J., Welsch, D. J. & Pelletier, J.-P. (2001) *Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases*. *Best Pract and Res Clin Rheumatol* **15** (5): 805-829
- Massague, J., Blain, S. W. & Lo, R. S. (2000) *TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders*. *Cell* **103**: 295-309
- Mátés, L., Nicolae, C., Mörgelin, M., Deák, F., Kiss, I. & Aszódi, A. (2004) *Mice lacking the extracellular matrix adaptor protein matrilin-2 develop without obvious abnormalities*. *Matrix Biol* **23**: 195-204
- Menzio, D., Gu, Z. F., Maton, P. N. & Bunnett, N. W. (1991) *Inhibition of peptidases potentiates enkephalin-stimulated contraction of gastric muscle cells*. *Am J Physiol* **261**: G 476-484
- Montenez, J. P., Kishore, B. K., Maldague, P. & Tulkens, P. M. (1994) *Leupeptin and E-64, inhibitors of cysteine proteinases, prevent gentamicin-induced lysosomal phospholipidosis in cultured rat fibroblasts*. *Toxicol Lett* **73**: 201-208

- Mostert, A. K., Dijkstra, P. F., Jansen, B. R., van Horn, J. R., de Graaf, B., Heutink, P. & Lindhout, D. (2003) *Familial multiple epiphyseal dysplasia due to a matrilin-3 mutation: Further delineation of the phenotype including 40 years follow-up*. Am J Med Genet A **120**: 490-497
- Mundlos, S. & Zabel, B. (1994) *Developmental expression of human cartilage matrix protein*. Dev Dyn **199**: 241-252
- Muratoglu, S., Krysan, K., Balász, M., Sheng, H., Zákány, R., Módis, L., Kiss, I. & Deák, F. (2000) *Primary structure of human matrilin-2, chromosome location of the MATN2 gene and conservation of an AT-AC intron in matrilin genes*. Cyt Cell Gen **90**: 323-327
- Nagase, H. (1999) *Activation mechanisms of matrix metalloproteinases*. Biol Chem Hoppe Seyler **378**: 151-160
- Neefjes, J. J. & Ploegh, H. L. (1992) *Inhibition of endosomal proteolytic activity by leupeptin blocks surface expression of MHC class II molecules and their conversion to SDS resistance alpha beta heterodimers in endosomes*. EMBO J **11**: 411-416
- Nitsche, D. P. (2001) *Strukturen und Wechselwirkungen von Matrilinen und von Thrombospondinen - multimere nichtkollagene Proteine der extrazellulären Matrix*. Dissertation, Universität zu Köln
- Ohno, S., Murakami, K., Tanimoto, K., Sugiyama, H., Makihira, S., Shibata, T., Yoneno, K., Kato, Y. & Tanne, K. (2003) *Immunohistochemical study of matrilin-1 in arthritic articular cartilage of the mandibular condyle*. J Oral Pathol Med **32**: 237-242
- Okimura, A., Okada, Y., Makihira, S., Oan, H., Yu, L., Tanne, K., Imai, K., Yamada, H., Kawamoto, T., Noshiro, M., Yan, W. & Kato, Y. (1997) *Enhancement of cartilage matrix protein synthesis in arthritic cartilage*. Arthritis Rheum **40**: 1029-1036
- Okumura, Y., Sato, H., Seiki, M. & Kido, H. (1997) *Proteolytic activation of the precursor of membrane type 1 matrix metalloproteinase by human plasmin, a possible cell surface activator*. FEBS Lett **402**: 181-184
- Otten, C., Wagener, R., Paulsson, M. & Zaucke, F. (2005) *Matrilin-3 mutations that cause chondrodysplasias interfere with protein trafficking while a mutation associated with hand osteoarthritis does not*. J Med Genet **42**(10): 774-779
- Paulsson, M. & Heinegård, D. (1979) *Matrix proteins bound to associatively prepared proteoglycans from bovine cartilage*. Biochem J **183**: 539-545
- Paulsson, M. & Heinegård, D. (1981) *Purification and structural characterisation of a cartilage matrix protein*. Biochem J **197**: 367-375
- Piecha, D., Muratoglu, S., Mörgelin, M., Hauser, N., Studeri, D., Kiss, I., Paulsson, M. & Deák, F. (1999) *Matrilin-2, a large, oligomeric matrix protein, is expressed by a great variety of cells and forms fibrillar networks*. J Biol Chem **274** (19): 13353-13361
- Piecha, D., Wiberg, C., Mörgelin, M., Reinhardt, D. P., Deák, F., Maurer, P. & Paulsson, M. (2002) *Matrilin-2 interacts with itself and with other extracellular matrix proteins*. Biochem J **367**: 715-721
- Porter, S., Clark, I. M., Kevorkian, L. & Edwards, D. R. (2005) *The ADAMTS metalloproteinases*. Biochem J **386**: 15-27
- Primakoff, P. & Myles, D. G. (2000) *The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity*. Trends Genet **16**: 83-87
- Pullig, O., Weseloh, G., Klatt, A. R., Wagener, R. & Swoboda, B. (2002) *Matrilin-3 in human articular cartilage: increased expression in osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage **10**: 253-263.
- Rao, Z., Handford, P., Mayhew, M., Knott, V., Brownlee, G. G., & Stuart, D. (1995) *The structure of a Ca<sup>2+</sup>-binding epidermal growth factor-like domain: Its role in protein-protein interactions*. Cell **82**: 131-141
- Robertson, M. J., Cunoosamy, M. P. & Clark, K. L. (1992) *Effects of peptidase inhibition on angiotensin receptor agonist and antagonist potency in rabbit isolated thoracic aorta*. Br J Pharmacol **106**: 166-172

- Rockwell, N. C., Krysan, D. J., Komiyama, T. & Fuller, R. S. (2002) *Precursor processing by Kex2/Furin proteases*. Chem Rev **102**: 4525-4548
- Rockwell, N. C. & Thorner, J. W. (2004) *The kindest cuts of all: crystal structures of Kex2 and furin reveal secrets of precursor processing*. Trends Biochem Sci **29** (2): 80-87
- Roghani, M., Becherer, J. D., Moss, M. L., Atherthon, R. E., Erdjument-Bromage, H., Arribas, J., Blackburn, R. K., Weskamp, G., Tempst, P. & Blobel, C. P. (1999) *Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity*. J Biol Chem **274**: 3531-3540
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> Edition, Cold Spring Harbor Laboratory
- Saxne, T. & Heinegård, D. (1989) *Involvement of nonarticular cartilage as demonstrated by release of a cartilage-specific protein, in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum **32**: 1080-1086
- Schäcke, H., Schumann, H. Hammami-Hauasli, N., Raghunath, M. & Bruckner-Tudermann, L. (1998) *Two forms of collagen XVII in keratinocytes: a full-length transmembrane protein and a soluble ectodomain*. J Biol Chem **273**: 25937-25943
- Schenk, S. & Quaranta, V. (2003) *Tales from the crypt[ic] sites of the extracellular matrix*. TRENDS Cell Biol **13** (7): 366-374
- Schlomann, U., Wildeboer, D., Webster, A., Antropova, O., Zeuschner, D., Knight, C. G., Docherty, A. J., Lambert, M., Skelton, L., Jockusch, H. & Bartsch, J. W. (2002) *The metalloprotease-disintegrin ADAM8. Processing by autocatalysis is required for proteolytic activity*. J Biol Chem **277**: 48210-48219
- Segat, D., Frie, C., Nitsche, D. P., Klatt, A. R., Piecha, D., Korpos, E., Deák, F., Wagener, R., Paulsson, M. & Smyth, N. (2000) *Expression of matrilin-1, -2 and -3 in developing mouse limbs and heart*. Matrix Biol **19**: 649-655
- Snellman, A., Tu, H., Väisänen, T., Kvist, A.-P., Huhtala, P. & Pihlajaniemi, T. (2000) *A short sequence in the N-terminal region is required for the trimerization of type XIII collagen and is conserved in other collagenous transmembrane proteins*. EMBO J **19**: 5051-5059
- Solorzano C. C., Ksontini, R., Pruitt, J. H., Auffenberg, T., Tannahill, C., Galardy, R. E., Schultz, G. P., MacKay, S. L., Copeland, E. M. 3<sup>rd</sup> & Moldawer, L. L. (1997) *A matrix metalloproteinase inhibitor prevents processing of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and abrogates endotoxin-induced lethality*. Shock **7**: 427-431
- Stamenkovic, I. (2000) *Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis*. Semin Cancer Biol **10**(6): 415-433
- Stefansson, S. E., Jonsson, H., Ingvarsson, T., Manulescu, I., Jonsson, H. H., Olafsdottir, G., Palsdottir, E., Stefansdottir, G., Sveinbjornsdottir, G., Frigge, M. L., Kong, A., Gulcher, J. R. & Stefansson, K. (2003) *Genomewide scan for hand osteoarthritis: A novel mutation in matrilin-3*. Am J Hum Genet **72**: 1448-1459
- Sternlicht, M. D. & Werb, Z. (2001) *How matrix metalloproteinases regulate cell behaviour*. Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 463-516
- Stirpe, N. S. & Trueb, B. (1997) *Gene regulation during cartilage differentiation: Temporal and spatial expression of link protein and cartilage matrix protein in the developing limb*. Development **107**: 23-33
- Stöcker, W., Grams, F., Baumann, U., Reinemer, P., Gomis-Rüth, F. X., McKay, D. B. & Bode, W. (1995) *The metzincins – topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, seralysins and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases*. Protein Sci **4**: 823-840
- Strongin, A. Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B. L., Grant, G. A. & Goldberg, G. I. (1995) *Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease*. J Biol Chem **270**: 5331-5338
- Sugimoto, K., Takahashi, M., Yamamoto, Y., Shimada, K. & Tanzawa, K. (1999) *Identification of aggrecanase activity in medium of cartilage culture*. J Biochem (Tokyo) **126**: 449-455

- Tamai, M., Matsumoto, K., Omura, S., Koyama, I., Ozawa, Y. & Hanada, K. (1986) *In vitro and in vivo inhibition of cysteine proteinases by EST, a new analog of E-64*. J Pharmacobiodyn **9**: 672-677
- Tamai, M., Yokoo, C., Murata, M., Oguma, K., Sota, K., Sato, E. & Kanaoka, Y. (1987) *Efficient synthetic method for ethyl(+)-(2S,3S)-3-[(S)-3-methyl-1-(3-methylbutylcarbonyl)butylcarbonyl]-2-oxiranecarboxylate (EST), a new inhibitor of cysteine proteinases*. Chem Pharm Bull **35**: 1098-1104
- Tortorella, M. D., Pratta, M., Liu, R. Q., Austin, J., Ross, O. H., Abbaszade, I., Burn, T. & Arner, E. (2000) *Sites of aggrecan cleavage by recombinant human aggrecanase-1 (ADAMTS-4)*. J Biol Chem **275**: 18566-18573
- Tyagi, S. C. (1992) *Inhibitors of human immunodeficiency virus-1 protease*. Biochem Cell Biol **70**: 309-315
- Umezawa, H. (1976) *Structures and activities of protease inhibitors of microbial origin*. Meth Enzymol **45**: 678-695
- Umezawa, H. (1985) *Low-molecular-weight immunomodifiers produced by micro-organisms*. Biotechnol Genet Eng Rev **3**: 255-273
- Väisänen, M.-R., Väisänen, T. & Pihlajaniemi, T. (2004) *The shed ectodomain of type XIII collagen affects cell behaviour in a matrix-dependent manner*. Biochem J **380**: 685-693
- Velasco-Loyden, G., Arribas, J. & Lopez-Casillas, F. (2004) *The shedding of betaglycan is regulated by pervanadate and mediated by membrane type matrix metalloprotease-1*. J Biol Chem **279**: 7721-7733
- Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G. V., Kronenberg, H. M. & Tabin, C. J. (1996) *Regulation of rate of chondrocyte differentiation by indian hedgehog and PTH-related protein*. Science **273**: 613-621
- Vortkamp, A. (2001) *Interaction of growth factors regulating chondrocyte differentiation in the developing embryo*. Osteoarthritis Cart **9** Suppl. A: S109-S117
- Wagener, R., Kobbe, B., & Paulsson, M. (1997) *Primary structure of matrilin-3, a new member of a family of extracellular matrix proteins related to cartilage matrix protein (matrilin-1) and von Willebrand factor*. FEBS Lett **413**: 129-134
- Wagener, R., Kobbe, B. & Paulsson, M. (1998a) *Matrilin-4, a new member of the matrilin family of extracellular proteins*. FEBS Lett **436**: 123-127
- Wagener, R., Kobbe, B. & Paulsson, M. (1998b). *Genomic organisation, alternative splicing and primary structure of human matrilin-4*. FEBS Lett **438**: 165-170
- Wagener, R., Kobbe, B., Aszódi, A., Liu, Z., Beier, D.R., & Paulsson, M. (2000) *Structure and mapping of the mouse matrilin-3 gene (Matn3), a member of a gene family containing a U12-type AT-AC intron*. Mamm. Genome **11**: 85-90
- Wagener, R., Ehlen, H. W. A., Ko, Y. P., Kobbe, B., Mann, H. H., Sengle, G. & Paulsson, M. (2005) *The matrilins - adaptor proteins in the extracellular matrix*. FEBS Lett **579**: 3323-3329
- Wang, W. M., Lee, S., Steiglit, B. M., Scott, I.C., Lebares, C. C., Allen, M. L., Brenner, M. C., Takahara, K. & Greenspan, D. S. (2003) *Transforming growth factor-beta induces secretion of activated ADAMTS-2 A procollagen III N-proteinase*. J Biol Chem **278**: 19549-19557
- Werb, Z. (1997) *ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology*. Cell **91**: 439-442
- Werb, Z. & Yan, Y. (1998) *A cellular striptease act*. Cell **282**: 1279-1280
- Whittaker, C. A. & Hynes, R. O. (2002) *Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: Widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere*. Mol Biol Cell **13**: 3369-3387
- Wiberg, C., Klatt, A. R., Wagener, R., Paulsson, M., Bateman, J. F., Heinegård, D. & Mörgelin, M. (2003) *Complexes of matrilin-1 and biglycan or decorin connect collagen VI microfibrils to both collagen II and aggrecan*. J Biol Chem **278**: 37698-37704
- Winterbottom, N., Tondravi, M. M., Harrington, T. L., Klier, F. G., Vertel, B. M. & Goetinck, P. F. (1992) *Cartilage matrix protein is a component of the collagen fibril of cartilage*. Dev Dyn **193**: 266-276

- Wu, J. J. & Eyre, D. R. (1998) *Matrilin-3 forms disulfide-linked oligomers with matrilin-1 in bovine epiphyseal cartilage*. J Biol Chem **273**: 17433-17438
- Yousef, G.M., Magklara, A., Chang, A., Jung, K., Katsaros, D. & Diamandis, E. P. (2001) *Cloning of a new member of the human kallikrein gene family, KLK14, which is down-regulated in different malignancies*. Cancer Res **61**: 3425-3431
- Zelzer, E., McLean, W., Ng, Y. S., Fukai, N., Reginato, A. M., Lovejoy, S., D'Amore, P. A. & Olsen, B. R. (2002) *Skeletal defects in VEGF(120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis*. Development **129**: 1893-1904
- Zucker, S., Drews, M., Conner, C., Foda, H. D., DeClerck, Y. A., Langley, K. E., Bahou, W. F., Docherty, A. J. & Cao, J. (1998) *Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binds to the catalytic domain of the cell surface receptor, membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP)* J Biol Chem **273**: 1216-1222
- Zyznar, E. S. (1981) *A rationale for the application of trasylol as a protease inhibitor in radioimmunoassay*. Life Sci **28**: 1861-1866

## Danke

Mein ganz besonderer Dank gilt Mats Paulsson und Raimund Wagener für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe unter einer hervorragenden Betreuung durchführen zu können. Für die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft und für alles, was ich in den letzten Jahren von ihnen lernen konnte.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. H. W. Klein und Herrn Prof. Dr. T. Langer für die Begutachtung der Dissertation bzw. die Übernahme des Prüfungsvorsitzes danken.

Ein weiteres Dankeschön geht an Wislav Kryzack für Mäuse, Alain Colige für Zellen und an Stefan Müller und die ZBA für „MALDIs“ und „Edmans“.

Vielen Dank auch an Birgit und die anderen TAs für praktische Hilfe und fürs Aushelfen, wenn mal wieder ein Puffer aufgebraucht war. Ohne sie wären die Labors wahrscheinlich schon lange in Chaos und Anarchie untergegangen...

Ein ganz herzlicher Dank geht auch den Rest der „Wageners“: Henning, Christiane (als Adoptivkind), Jan, Yaping, Andreas, Gerhard, Patrick und Sebastian und an die anderen Kollegen der BCII für ein unvergleichliches Arbeitsklima, Freundschaft, Antikörper, Zellen, Hilfe, Diskussion und Parties. Und an Uli für die unzähligen Kaffeepausen.

Mein letzter und wichtigster Dank geht an Cornelia für einfach alles, was wir zusammen erleben dürfen. Und an meine Eltern und Schwestern und an Christa für Rückhalt und Unterstützung in allen Lagen.

## Teilpublikationen

### Zeitschriftenbeiträge

Budde, B., Blumbach, K., Ylöstalo, J., Zaucke, F., **Ehlen, H. W. A.**, Wagener, R., Ala-Kokko, L., Paulsson, M., Bruckner, P. & Grässel, S. (2005) *Altered integration of matrilin-3 into cartilage extra-cellular matrix in the absence of collagen IX*. Mol Cell Biol **25** (23): 10465-10478

Wagener, R., **Ehlen, H. W. A.**, Ko, Y. P., Mann, H. H., Sengle, G., & Paulsson, M. (2005) *The matrilins – adaptor proteins in the extracellular matrix*. FEBS Lett **579**(15): 3323-3329

### Poster

**Ehlen, H. W. A.**, Paulsson, M. & Wagener, R. (Okt. 2005) *Proteolytic processing of matrilins*. Symposium: Extracellular Matrix – A Bridge to Scandinavia, Münster, Deutschland

**Ehlen, H. W. A.**, Paulsson, M. & Wagener, R. (März 2005) *Proteolytic processing of matrilins*. First Joint Meeting of the French and German Connective Tissue Societies, Köln, Deutschland

**Ehlen, H. W. A.**, Paulsson, M. & Wagener, R. (Juli 2004) *Proteolytic processing of matrilins*. XIXth Meeting of the Federation of European Connective Tissue Societies, Giardini Naxos / Taormina, Italien

**Ehlen, H. W. A.**, Sengle, G., Klatt, A. R., Paulsson, M. & Wagener, R. (Juli 2002) *Proteolytic processing of matrilins*. XVIIIth Meeting of the Federation of European Connective Tissue Societies, Brighton, England

## Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von oben angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. med. Mats Paulsson betreut worden.

Köln, den

## Lebenslauf

### Persönliche Angaben:

Name: Ehlen  
Vornamen: Harald Wilhelm Antonius  
Geburtsdatum / -ort: 22. 7. 1975 in Köln  
Anschrift: Bachemer Str. 241, 50935 Köln  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Schulbildung:

1981-1985 Besuch der Gemeinschaftsgrundschule Geilenkircher Straße, Köln

1985-1994 Besuch des städt. Apostelgymnasiums Köln  
Abschluss: allgemeine Hochschulreife

### Zivildienst

1. 9. 1994 – 31. 10. 1995 Rheinische Schule für Körperbehinderte, Alter Militärring 96, 50933 Köln

### Hochschulbildung:

1. 10. 1995 – 5.2. 2002 Studium der Biologie an der Universität zu Köln  
Diplomarbeit am Zentrum für Biochemie, medizinische Fakultät, Universität zu Köln. Thema: „Untersuchungen der potentiellen Proteaseschnittstelle im C-terminalen Bereich der Matriline mittels *site-directed-mutagenesis*“.  
Abschluss: Diplom-Biologe

### Doktorarbeit

seit 6. 2. 2002 Doktorarbeit in physiologischer Chemie (biologische Richtung) an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln, durchgeführt bei Prof. Dr. M. Paulsson, Zentrum für Biochemie der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln.